

Institut für Veterinärbakteriologie
Abteilung für Geflügel- und Kaninchenkrankheiten
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor *ad interim*: Prof. Dr. Dr. h.c. Roger Stephan

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Dr. Nina Wolfrum

**Experimentelle Studie zur immunologischen Wirkung
eines auf Virus-ähnlichen Partikeln basierenden Impfstoffes
gegen die Infektiöse Laryngotracheitis
beim Huhn**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Julia Schädler

Tierärztin
aus Biberach an der Riß, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Richard K. Hoop, Referent
Prof. Dr. sc. nat. Cornel Fraefel, Korreferent

2018

Gewidmet meiner Familie.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 1 |
| 1.1 | Zusammenfassung..... | 1 |
| 1.2 | Summary..... | 2 |
| 2 | LITERATURÜBERSICHT..... | 3 |
| 2.1 | Herpesviren - Taxonomie, Morphologie und Replikation | 3 |
| 2.2 | Das <i>Gallide Alphaherpesvirus 1</i> (GaHV-1, Virus der Infektiösen Laryngotracheitis, ILTV)..... | 4 |
| 2.3 | Infektiöse Laryngotracheitis (ILT) | 5 |
| 2.3.1 | Epidemiologie | 7 |
| 2.3.2 | Prävention und Kontrolle von ILT..... | 7 |
| 2.3.3 | Bewertung gegenwärtig erhältlicher ILT-Impfstoffklassen..... | 9 |
| 2.4 | ILTV-Glykoproteine..... | 11 |
| 2.4.1 | Glykoprotein B (gB, U _L 27) | 12 |
| 2.4.2 | Glykoprotein C (gC, U _L 44)..... | 13 |
| 2.4.3 | Glykoprotein D (gD, U _S 6) | 14 |
| 2.4.4 | Glykoprotein G (gG, U _S 4)..... | 15 |
| 2.5 | Virus-like particles (VLPs, Virus-ähnliche Teilchen)..... | 16 |
| 2.5.1 | Aufbau der durch ILTV-Glykoproteine pseudotypisierten VLPs..... | 18 |
| 2.6 | Adjuvantien | 19 |
| 2.6.1 | Aviäre Zytokine als Adjuvantien | 21 |
| 2.6.2 | Interleukin 2 des Huhnes (Chicken Interleukin 2, ChIL-2) | 23 |
| 2.6.3 | Interleukin 18 des Huhnes (Chicken Interleukin 18, ChIL-18) | 25 |
| 2.7 | <i>In-ovo</i>-Vakzination | 27 |
| 2.8 | Phänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes von Hühnern mittels Durchflusszytometrie..... | 29 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN | 31 |
| 3.1 | Reagenzien | 31 |
| 3.2 | Enzyme und Puffer | 34 |

| | | |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3 | Plasmide und DNA..... | 35 |
| 3.4 | Primer | 36 |
| 3.5 | Verwendete Kits | 38 |
| 3.6 | Verwendete Bakterienstämme | 39 |
| 3.7 | Verwendete Zelllinie | 39 |
| 3.8 | Antikörper | 40 |
| 3.9 | Virus | 41 |
| 3.10 | Mikrobiologische Methoden | 42 |
| 3.10.1 | Herstellung chemisch kompetenter Bakterien | 42 |
| 3.10.2 | Transformation kompetenter Bakterien | 42 |
| 3.10.3 | Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien..... | 43 |
| 3.10.4 | Isolierung von Endotoxin-freier Plasmid-DNA aus Bakterien | 43 |
| 3.10.5 | Bestimmung des Endotoxingehaltes | 44 |
| 3.11 | Zellbiologische Methoden..... | 44 |
| 3.11.1 | Kultivierung von adhärenenten Zelllinien | 44 |
| 3.11.2 | Auftauen von eukaryontischen Zellen | 44 |
| 3.11.3 | Transfektion | 45 |
| 3.11.4 | Immunogoldmarkierung und Elektronenmikroskopie | 46 |
| 3.12 | Molekularbiologische Methoden | 47 |
| 3.12.1 | Gewinnung von VLPs..... | 47 |
| 3.12.2 | Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen | 47 |
| 3.12.3 | Isolierung von RNA aus Gewebe..... | 48 |
| 3.12.4 | Restriktion von Plasmid DNA | 49 |
| 3.12.5 | Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gel- elektrophorese | 49 |
| 3.12.6 | DNA-Aufreinigung | 50 |
| 3.12.7 | Dephosphorylierung von DNA mittels Intestinaler Phosphatase des Kalbs (Calf Intestinal Phosphatase, CIP)..... | 50 |
| 3.12.8 | TOPO-Cloning..... | 50 |
| 3.12.9 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 51 |
| 3.12.10 | Ligation | 51 |
| 3.12.11 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 52 |

| | | |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.12.12 | Addition von 3' A-Überhängen bei der Klonierung in pcDNA3_3 TOPO..... | 53 |
| 3.12.13 | Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)..... | 53 |
| 3.13 | Proteinbiochemische Methoden..... | 55 |
| 3.13.1 | Gewinnung von Proben für Western Blots | 55 |
| 3.13.1.1 | Gewinnung proteinhaltiger Zellkulturüberstände | 55 |
| 3.13.1.1.1 | Zelllyse mittels RIPA-Puffer | 55 |
| 3.13.1.1.2 | Isolierung von Protein mittels HA-Markierung..... | 55 |
| 3.13.1.2 | Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 56 |
| 3.13.1.2.1 | Micro BCA™ Protein Assay Kit | 56 |
| 3.13.1.2.2 | Methode nach Bradford | 56 |
| 3.13.1.3 | Säure-Präzipitation..... | 57 |
| 3.13.2 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) | 57 |
| 3.13.3 | Western-Blot-Analyse und Antikörperdetektion | 59 |
| 3.13.4 | Goldfärbung der aufgereinigten Glykoproteine | 60 |
| 3.13.5 | Maleylierung von VLP-gB | 61 |
| 3.14 | Experimentelle Vakzinationen..... | 63 |
| 3.14.1 | Bestimmung der Impfstoffdosis..... | 63 |
| 3.14.1.1 | Relative Quantifizierung der VLP-Oberflächenglykoproteine | 63 |
| 3.14.2 | Tierhaltung..... | 64 |
| 3.14.3 | Impfschema..... | 64 |
| 3.14.3.1 | <i>In-ovo</i> -Vakzination | 64 |
| 3.14.3.2 | Impfung an Tag 14..... | 65 |
| 3.14.3.3 | Impfprotokolle | 66 |
| 3.14.4 | Probennahme..... | 68 |
| 3.14.4.1 | Blutentnahme | 68 |
| 3.14.4.2 | Gewichtsbestimmung..... | 68 |
| 3.14.4.3 | Gewinnung von Organen | 69 |
| 3.15 | Bestimmung der Immunantwort..... | 69 |
| 3.15.1 | Bestimmung der humoralen Immunreaktion | 69 |
| 3.15.1.1.1 | Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) zur Detektion von Antikörpern gegen die Ober- | |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| flächenglykoproteine gB, gC und gD | 69 |
| 3.15.1.2 ELISA zur Detektion von Antikörpern gegen das Nicht-Struktur- glykoprotein gG | 70 |
| 3.15.2 Bestimmung der zellulären Immunreaktion..... | 71 |
| 3.15.2.1 Quantifizierung der T-Lymphozyten aus Organproben..... | 71 |
| 3.15.2.1.1 Isolierung von Lymphozyten | 72 |
| 3.15.2.1.2 ELISpot-Assay | 72 |
| 3.15.2.1.3 Bestimmung der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten-Subpopulationen..... | 73 |
| 3.15.2.1.3.1 Diskontinuierliche Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMC..... | 73 |
| 3.15.2.1.3.2 Markierung der Lymphozytensubpopulationen | 74 |
| 3.15.2.1.3.3 Fluorescence-activated cell scanning (FACS) | 75 |
| 4 ERGEBNISSE | 77 |
| 4.1 Herstellung der Impfstoffkomponenten | 77 |
| 4.1.1 Herstellung der VLPs..... | 77 |
| 4.1.1.1 Vermehrung von Plasmid durch Transformation in kompetenten <i>E.coli</i> .. | 77 |
| 4.1.2 Expression der pseudotypisierten VLPs | 78 |
| 4.1.2.1 Beurteilung der morphologischen Integrität der VLPs | 78 |
| 4.1.2.2 Detektion der VLPs mittels Western Blot..... | 80 |
| 4.1.2.3 Maleylierung von VLP-gB | 81 |
| 4.1.3 Herstellung der Adjuvantien..... | 82 |
| 4.1.3.1 Klonierung der Expressionsvektoren | 82 |
| 4.1.3.2 Amplifikation von ChIL-2 und ChIL-18 | 83 |
| 4.1.3.3 Klonierung von ChIL-2 und ChIL-18 in die jeweiligen Expressions- vektoren..... | 83 |
| 4.1.4 ChIL-Expression <i>in vitro</i> | 84 |
| 4.1.4.1 Nachweis von ChIL-2 und ChIL-18 mittels Western Blot | 84 |
| 4.1.4.2 Nachweis von ChIL-2- und ChIL-18-RNA | 86 |
| 4.1.4.3 Endotoxin-freie Produktion der Adjuvantien pcDNA-ChIL-2 und pcDNA-ChIL-18 | 88 |
| 4.2 Experimentelle Vakzinationen..... | 88 |
| 4.2.1 Quantifizierung der VLPs..... | 88 |
| 4.2.1.1 Aufreinigung der Glykoproteine und Detektion mittels Goldfärbung und Western Blot | 88 |

| | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.1.2 | Relative Quantifizierung der VLP-Antigene | 91 |
| 4.2.2 | Verträglichkeit des Impfstoffes..... | 93 |
| 4.2.2.1 | Effekt der <i>in-ovo</i> -Impfung auf die Schlupfrate | 93 |
| 4.2.2.2 | Effekt der Impfstoffapplikation auf das Allgemeinbefinden | 94 |
| 4.2.2.3 | Effekt der Impfstoffapplikation auf die Gewichtsentwicklung..... | 95 |
| 4.2.3 | Bestimmung der Immunantwort | 96 |
| 4.2.3.1 | Bestimmung der humoralen Immunreaktion | 96 |
| 4.2.3.1.1 | ELISA zur Detektion von Antikörpern gegen ILTV-Oberflächenglyko- proteine | 96 |
| 4.2.3.1.2 | ELISA zur Detektion von Antikörpern gegen das Nicht-Struktur- glykoprotein gG | 97 |
| 4.2.3.2 | Bestimmung der zellulären Immunreaktion..... | 99 |
| 4.2.3.2.1 | FACS zur Bestimmung von Subpopulationen der T-Lymphozyten..... | 99 |
| 4.2.3.2.2 | ELISpot-Assay zur Quantifizierung aktivierter T-Lymphozyten | 106 |
| 4.2.3.2.3 | Nachweis von Interleukin-mRNA | 108 |
| 5 | DISKUSSION..... | 113 |
| 5.1 | Charakterisierung der VLPs | 113 |
| 5.2 | Modifikation der VLPs - Maleylierung..... | 113 |
| 5.3 | Charakterisierung der ChIL exprimierenden Plasmide | 114 |
| 5.4 | Impfkonzep..... | 116 |
| 5.4.1 | DNA-Adjuvantien..... | 116 |
| 5.4.2 | Applikationsmethode und Auffrischungsimpfungen | 116 |
| 5.4.3 | Dosierung..... | 117 |
| 5.4.4 | Wahl der Adjuvantien und Impfzeitpunkt | 118 |
| 5.4.4.1 | ChIL-2..... | 118 |
| 5.4.4.2 | ChIL-18..... | 119 |
| 5.4.5 | VLP-basierte Impfstoffe – Einfluss von Applikationsart, Dosis und Zeitpunkt..... | 120 |
| 5.5 | Verträglichkeit des Impfstoffes..... | 121 |
| 5.6 | Wirkung des Impfstoffes | 123 |
| 5.6.1 | Die zelluläre Immunreaktion – FACS | 125 |
| 5.7 | Ausbleibende oder geringe Immunantwort..... | 127 |

| | | |
|------------|----------------------------------------------------|------------|
| 5.7.1 | Aktivierung des Immunsystems durch das Vakzin..... | 127 |
| 5.7.2 | Funktionelle Reife des Immunsystems | 128 |
| 5.7.3 | Impfstoffdosis | 129 |
| 5.7.4 | Zeitpunkt der Probennahme | 129 |
| 5.8 | Schlussfolgerung | 131 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 132 |
| 7 | LEBENS LAUF | 163 |
| 8 | DANKSAGUNG..... | 164 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abb. 2-1 Schema der einzelnen Komponenten zur VLP-Produktion. _____ | 19 |
| Abb. 3-1 Schematische Darstellung der Bindung von Maleinanhidrid an die freie Aminogruppe eines Proteins. _____ | 61 |
| Abb. 3-2 Schema der Impfstoffapplikation in ovo. _____ | 66 |
| Abb. 4-1 Restriktionsmuster der enzymatisch verdauten Plasmide. _____ | 77 |
| Abb. 4-2 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der VLPs. _____ | 79 |
| Abb. 4-3 Analyse der VLP-Produktion mittels Western Blot. _____ | 80 |
| Abb. 4-4 Detektion freier (nicht maleylierter) Aminogruppen. _____ | 81 |
| Abb. 4-5 Schematische Darstellung der getesteten Expressionsplasmide für ChIL-2 und ChIL-18. _____ | 82 |
| Abb. 4-6 Überprüfung der Größe der PCR-Produkte für ChIL-2 (A, C), ChIL-18 (B, D) durch Auftrennung im elektrischen Feld. _____ | 83 |
| Abb. 4-7 Restriktionsfragmente der Klonierungsprodukte für pCAGGS-ChIL-2 (A), pCAGGS-ChIL-18 (B), pcDNA-ChIL-2 (C) und pcDNA-ChIL-18 (D). _____ | 84 |
| Abb. 4-8 Analyse der Interleukinexpression mittels Western Blot. _____ | 85 |
| Abb. 4-9 Nachweis von Aktin mittels Western Blot in Zelllysat bzw. Überstand. _____ | 86 |
| Abb. 4-10 Vergleich der RNA-Konzentration beider Interleukine ChIL-2 und -18 nach Transfektion. _____ | 87 |
| Abb. 4-11 Aufreinigung der Glykoproteine gB, gC, gD und gG (A, B, C, D). _____ | 89 |
| Abb. 4-12 Western Blot der einzelnen Aufreinigungsschritte von Glykoprotein B (A) und Glykoprotein G (B). _____ | 90 |
| Abb. 4-13 Relative Quantifizierung der VLPs für Versuch B und C. _____ | 91 |
| Abb. 4-14 Gewichtszunahmen der einzelnen Küken, gruppiert nach verabreichtem Impfstoff. _____ | 96 |
| Abb. 4-15 Messung der optischen Dichte bei 450 nm zur Detektion von Antikörpern gegen das Nicht-Strukturglykoprotein gG in Versuch A. _____ | 98 |
| Abb. 4-16 Messung der optischen Dichte bei 450 nm zur Detektion von Antikörpern gegen das Nicht-Strukturglykoprotein gG in Versuch B. _____ | 99 |
| Abb. 4-17 Typisches Gating der durchflusszytometrischen Messung verschiedener Oberflächenantigene aus Hühnerlymphozyten. _____ | 100 |
| Abb. 4-18 Verhältnis zwischen schwacher und intensiver CD3 ⁺ CD8 ⁺ -T-Lymphozytensubpopulation in Versuchsansatz C. _____ | 104 |
| Abb. 4-19 CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -Quotient der T-Lymphozyten in Versuchsansatz C. _____ | 105 |
| Abb. 4-20 ELISpot aus Lymphozyten der Milz von Tieren aus Versuch A. _____ | 106 |
| Abb. 4-21 ELISpot aus Lymphozyten der Milz der Tiere aus Versuch C an LT 36. _____ | 107 |
| Abb. 4-22 Detektion von Genomsequenzen von ChIL-2 mittels qRT-PCR. _____ | 109 |
| Abb. 4-23 Detektion von Genomsequenzen mittels qRT-PCR aus regelmäßig entnommenen Blutproben. _____ | 111 |
| Abb. 4-24 Detektion von Genomsequenzen mittels qRT-PCR aus Organproben. _____ | 112 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Tabelle 3-1 Chemische Reagenzien und ihre Herkunft.</i> | 31 |
| <i>Tabelle 3-2 Enzyme und Puffer und ihre Herkunft.</i> | 34 |
| <i>Tabelle 3-3 Plasmide und DNA und ihre Herkunft, mit Eigenschaften und Aufbau.</i> | 35 |
| <i>Tabelle 3-4 Oligonukleotide zur Klonierung von ChIL-2 bzw. ChIL-18 in die Expressionsvektoren pcDNA3_3 TOPO und pCAGGS.</i> | 36 |
| <i>Tabelle 3-5 Kits zur Extraktion, Purifikation und für diagnostische Tests und ihre Herkunft.</i> | 38 |
| <i>Tabelle 3-6 Bakterienstämme, ihr Genotyp und ihre Herkunft.</i> | 39 |
| <i>Tabelle 3-7 Zelllinien, ihre Eigenschaften und ihre Herkunft.</i> | 39 |
| <i>Tabelle 3-8 Antikörper und ihre Herkunft.</i> | 40 |
| <i>Tabelle 3-9 Transfektionsansätze.</i> | 45 |
| <i>Tabelle 3-10 Temperatur- und Zeitverlauf eines PCR-Laufes.</i> | 52 |
| <i>Tabelle 3-11 Temperatur- und Zeitverlauf eines qRT-PCR-Laufes.</i> | 54 |
| <i>Tabelle 3-12 Zusammensetzung und Volumen pro Impfstoffdosis in Versuch B und C.</i> | 65 |
| <i>Tabelle 3-13 Konzentrationen der Antikörper zur Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen aus Blut mittels FACS.</i> | 74 |
| <i>Tabelle 4-1 Restriktionsendonukleasen und resultierende Fragmentgrößen der Plasmide.</i> | 78 |
| <i>Tabelle 4-2 Restriktionsendonukleasen und resultierende Fragmentgrößen der Plasmide.</i> | 84 |
| <i>Tabelle 4-3 Konzentration von Antigen und Kapsidprotein.</i> | 92 |
| <i>Tabelle 4-4 Schlupfrate und Vitalität der Küken nach in-ovo-Vakzination am 18. Bebrütungstag.</i> | 93 |
| <i>Tabelle 4-5 Prozentualer Anteil der CD3⁺CD4⁺-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl aus FACS-Analyse.</i> | 101 |
| <i>Tabelle 4-6 Prozentualer Anteil der CD3⁺CD8⁺-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl aus FACS-Analyse.</i> | 102 |
| <i>Tabelle 4-7 Prozentualer Anteil der beiden CD3+CD8+-T-Zellsubpopulationen (intensiv/schwach) aus FACS-Analyse.</i> | 103 |
| <i>Tabelle 4-8 CD4⁺/CD8⁺-Quotient aus FACS-Analyse.</i> | 105 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| ∞ | unendlich |
| % | Prozent |
| x | mal |
| \geq | größer oder gleich als |
| \leq | kleiner oder gleich als |
| > | größer als |
| < | kleiner als |
| α | anti |
| AAC | Antibody Antigen Complexes, Antikörper-Antigen-Komplexe |
| Abb | Abbildung |
| APC | Antigen presenting cell, Antigen präsentierende Zelle |
| B | Bursa fabricii |
| BHV | Bovines Herpesvirus |
| BP | Bindeprotein |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| C3 | Name eines Moleküls des Komplementsystems |
| C3b | Name eines Moleküls des Komplementsystems |
| C5 | Name eines Moleküls des Komplementsystems |
| CD | Cluster of differentiation, Unterscheidungsgruppe |
| cDNA | complementary DNA, komplementäre DNS |
| CEO | Chicken embryo origin, Ursprung im Hühnerembryo |
| ChIL | Chicken interleukin, Hühnerinterleukin |
| ChINF- γ | Chicken interferon- γ , Hühnerinterferon- γ |
| CIP | Calf intestinal phosphatase, Intestinale Phosphatase des Kalbs |
| cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadratzentimeter |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CNF | Colony stimulating factor, Kolonie stimulierender Faktor |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| Comp. | Compensation, Kompensation |
| CT | Cycle threshold, Schwellenwert der PCR-Zyklen |
| Cu | Kupfer |
| Δ | Differenz |
| DC | Dendritic cells, dendritische Zellen |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DIVA | Differentiating infected from vaccinated animals, Unterscheidung geimpfter von infizierten Tieren |
| DNA | Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| ECL | Enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszenz |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |

| | |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| ED | Embryonation day, Embryonaltag |
| EHV | Equines Herpesvirus |
| <i>env</i> | Virales Gen: Oberflächenglykoproteine |
| EU | Endotoxin Unit, Endotoxineinheit |
| FACS | Fluorescence-activated cell scanning, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FPV | Fowl pox virus, Hühnerpockenvirus |
| FSC-A | Forward Scatter-Area, Fläche im Vorwärtsstreulicht |
| FSC-H | Forward Scatter-Height, Höhe im Vorwärtsstreulicht |
| FT | Flow through, Überstand |
| g | Gramm |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung, Gravitationsfeldstärke |
| G | Gauge |
| G/C | Verhältnis zwischen Guanin und Cytosin |
| gA | Glykoprotein A |
| <i>gag</i> | Virales Gen: gruppenspezifisches Antigen |
| GaHV-1 | Gallides Alphaherpesvirus 1 (Virus der Infektiösen Laryngotracheitis) |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Haushaltsgen, konstitutiv exprimiertes Gen) |
| γ c | γ -Chain, γ -Kette |
| gB | Glykoprotein B |
| gC | Glykoprotein C |
| gD | Glykoprotein D |
| gE | Glykoprotein E |
| gF | Glykoprotein F |
| gG | Glykoprotein G |
| gH | Glykoprotein H |
| gI | Glykoprotein I |
| gJ | Glykoprotein J |
| gK | Glykoprotein K |
| gL | Glykoprotein L |
| gM | Glykoprotein M |
| gN | Glykoprotein N |
| H ₂ O | Wasser |
| HA | Hämagglutinin |
| HRP | Horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase |
| HVEM | Herpes virus entry mediator, Eintrittsmediator von Herpesviren |
| HVT | Herpesvirus of turkeys (Meleagrid Herpesvirus), Putenherpesvirus |
| IBDV | Infectious bursal disease virus, Virus der Infektiösen Bursitis |
| IBD | Infectious bronchitis virus, Virus der Infektiösen Bronchitis |
| IFA | Incomplete Freund's Adjuvant, Unvollständiges Freund'sches Adjuvans |
| Ig (IgA, IgG, IgM, IgY) | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IL-2R | IL-2-Rezeptor |
| ILT | Infektiöse Laryngotracheitis |
| ILTV | Virus der Infektiösen Laryngotracheitis |

| | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| INF- γ | Interferon γ |
| IR | Internal repeat, in Wiederholungen vorliegende Sequenz innerhalb des Genoms |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani |
| Log | Logarithmus |
| LSL | Lohmann Selected Leghorn |
| LT | Lebenstag |
| M | Mol |
| M. | Musculus, Muskel |
| mA | Milliampère |
| mBSA | maleyliertes BSA |
| Med | Median |
| mg | Milligramm |
| MDV | Marek's disease virus (Gallides Herpesvirus 2 und 3), Virus der Marekschen Krankheit |
| MHC | Major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimol |
| mm ² | Quadratmillimeter |
| MMLV | Moloney murines Leukämievirus |
| mol/l | Mol pro Liter |
| mRNA | Messenger RNA |
| mVLP-gB | maleylierte VLP-gB |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| μ m | Mikrometer |
| μ M | Mikromol |
| N | Normalität, Äquivalentkonzentration |
| NDV | Newcastle Disease Virus, Virus der Newcastle-Krankheit |
| neg | negativ |
| ng | Nanogramm |
| NK | natürliche Killerzellen |
| nm | Nanometer |
| NRGK | Nationales Referenzzentrum für Geflügel- und Kaninchenkrankheiten (Schweiz) |
| OD | optische Dichte |
| OMV | Outer Membrane Vesicles, Vesikel der äußeren Membran |
| ORF | Open reading frame, offener Leserahmen |
| p | Plasmid |
| p30 | Teil der retroviralen Kapsidproteine |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |

| | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pa | Pascal |
| PAMP | Pathogen associated molecular pattern, Pathogen-assoziiertes, molekulares Muster |
| P _{CMV} | CMV-Promotor |
| PCR | Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion |
| PDGFR | Platelet derived growth factor receptor, Rezeptor des von Blutplättchen abgeleiteten Wachstumsfaktors |
| PE | Phycoerythrin |
| pLgag | für die retroviralen Kapsidproteine codierendes Plasmid |
| PMBC | Peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| <i>pol</i> | Virales Gen: Enzyme der Retroviren |
| polyA | Polyadenylierungssequenz |
| pos | positiv |
| PRR | Pattern recognition receptor, Mustererkennungsrezeptor |
| PrV | Pseudorabies-Virus, Aujeszky-Virus |
| PsHV-1 | Psittazides Herpesvirus 1 |
| qRT-PCR | Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction, Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion |
| R | Rezeptor |
| RFLP | Restriction fragment length polymorphism, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus |
| RNA | Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure |
| rpm | Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute |
| S.O.C. | Super Optimal Broth (Nährmedium) |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| sec | Sekunde |
| SI | Stain index, Färbekennzahl |
| SS | Sekretionssequenz |
| SSC-A | Side scatter Area, Fläche im Seitwärtsstreulicht |
| SSC-H | Side scatter Height, Höhe im Seitwärtsstreulicht |
| T | Thymus |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> (Bakterium) |
| TCO | Tissue culture origin, Ursprung in der Zellkultur |
| TGF | Transforming growth factor, verändernder Wachstumsfaktor |
| TK | Thymidinkinase |
| TM | Transmembrandomäne |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TOPO | Typ-I-DNA-Topoisomerase |
| TR | Terminal repeats, in Wiederholungen vorliegende Sequenz am Genomende |
| T _{reg} | regulatorische T-Zellen |
| U | Unified atomic mass unit, atomare Masseneinheit |
| u. a. | unter anderem |
| U _L | Unique long region; lange, einmalig vorhandene Genomregion |
| U _S | Unique short region; kurze, einmalig vorhandene Genomregion |

| | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------|
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| vCKBP | Viral chemokine binding protein, virales, Chemokine bindendes Protein |
| vgl. | vergleiche |
| VLP | Virus-like particle, Virus-ähnliches Teilchen |
| v/v | Volumenprozent |
| W | Watt |
| wt | Wildtyp |

ANGLIZISMENVERZEICHNIS

| | |
|---------------|----------------------------------------------|
| annealing | Anlagerung |
| assay | Untersuchung |
| attachment | Bindung, Befestigung |
| blank | leer |
| to block | blockieren |
| blot | Abklatsch |
| blunt ends | „glatte“ Enden |
| to boost | antreiben, verstärken |
| budding | Knospung |
| buffer | Puffer |
| cloning | Klonierung |
| cluster | Haufen, Traube, Verbund |
| to coat | bedecken |
| gate | Tür, Tor |
| gold | Gold |
| insert | einzufügendes DNA-Fragment |
| kit | Ausrüstung, Bausatz |
| level | Stufe, Höhe, Grad |
| low | niedrig |
| medium | mittel |
| messenger | Bote |
| pellet | Kügelchen, Rückstand |
| primer | Oligonukleotid für PCR |
| proof reading | Korrekturlesefunktion |
| to quench | löschen, abfangen |
| scavenger | Plünderer |
| spot | Punkt, Fleck |
| stain | Färbung |
| tag | Markierung |
| vaccinal | impfbedingt, durch die Impfung hervorgerufen |
| well | Vertiefung |

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Zusammenfassung

Die Infektiöse Laryngotracheitis (ILT) ist eine respiratorische Krankheit von Hühnern. Je nach Erregerstamm treten nur milde Symptome wie Nasenausfluss auf, schwere Krankheitsverläufe enden tödlich. Doch bereits eine Verminderung von Gewichtszunahme oder Eierproduktion verursacht wirtschaftliche Einbußen. Der wirkungsvollste Schutz wird durch attenuierte Lebendvakzine erlangt, welche jedoch das Risiko der Mutation oder Rekombination mit Feldviren bergen, was zur Bildung neuer, pathogener Viren führen kann. Daher bedarf es eines sicheren und effizienten Impfstoffes.

Wir entwickelten einen auf Virus-ähnlichen Partikeln (VLP) basierten Impfstoff mit den in die Virushülle eingelagerten ILTV-Glykoproteinen gB, gC, gD und gG. VLPs sind weder infektiös noch replikationsfähig und präsentieren das Zielantigen in hoher Dichte.

Eine erste *in-vivo*-Studie bestätigte die Verträglichkeit der *in ovo* applizierten VLPs anhand von Schlupfrate und Gewichtsentwicklung.

Weitere Versuche waren auf den Nachweis der Immunantwort ausgerichtet: Die Applikation von VLP-gG und plasmidcodiertem Interleukin 2 *in ovo* und an Tag 14 resultierte in der Bildung von Antikörpern, welche zur Überwindung des Immunevasionsmechanismus durch gG führen sollen.

Um eine zelluläre Immunreaktion hervorzurufen wurden maleylierte VLP-gB und IL-18-Plasmid nach Schlupf injiziert, was zu einer Veränderung des $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten zugunsten der zytotoxischen T-Zellen führte.

Stichworte: Virus-ähnliche Partikel, Infektiöse Laryngotracheitis, Impfstoff, *in ovo*, Interleukin

1.2 Summary

Infectious laryngotracheitis (ILT) is a respiratory disease of chicken. Depending on the virus strain mild symptoms like nasal discharge up to lethal forms are observed. But even a reduced weight gain or a decreased egg production cause massive economical losses. The most efficient way of protection is the immunization with live attenuated vaccines. However, they pose a certain risk of mutating or recombining with field strains, resulting in new pathogenic variants. The need for a safe and efficient vaccine is obvious.

We developed a vaccine based on virus-like particles (VLPs) displaying the ILTV glycoproteins gB, gC, gD and gG on their surface. VLPs are neither infectious nor replication competent and offer the opportunity to present antigens in high density at their surface.

Hatching rate and weight gain revealed no interference of the VLPs with the embryo or chicken development. VLP-gG in combination with plasmid encoded chicken interleukin 2 was delivered *in ovo*, followed by a booster at day 14. This led to the formation of antibodies against gG, which are supposed to prevent the viral immune-evasion mechanisms initiated by gG.

In order to elicit cell-mediated immune responses, plasmid encoded IL-18 and maleylated VLP-gB were delivered post-hatch which resulted in a shift of the $CD4^+/CD8^+$ ratio towards the cytotoxic T-cells.

Keywords: virus-like particle, infectious laryngotracheitis, vaccine, *in ovo*, interleukin

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Herpesviren - Taxonomie, Morphologie und Replikation

Herpesviren zählen zur Familie der DNA-Viren. Derzeit umfasst die Ordnung Herpesvirales über 130 Vertreter, die neben Säugern, Vögeln und Reptilien, auch Fische und Amphibien, sowie – in einem beschriebenen Fall – Invertebraten infizieren können (Le Deuff et al., 1994; McGeoch et al., 2000). Die Zugehörigkeit zu dieser Ordnung beruht auf sich gleichender Partikelmorphologie und ähnlichen molekularbiologischen Eigenschaften.

Die für Säuger und Vögel spezifischen Erreger zählen zur Familie der Herpesviridae. Da die einzelnen Viren dieser Familie eine Vielfalt biologischer Nischen besetzen und sich daher hinsichtlich ihres Zelltropismus, ihrer Pathogenität und ihrer Vermehrungseigenschaften zum Teil stark unterscheiden, werden sie drei Unterfamilien, den Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae, zugeordnet (Davison, 2010).

Gemeinsames, charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, lebenslang latent im Wirtsorganismus zu verbleiben.

Die Virionen der Herpesviren setzen sich aus vier Hauptstrukturelementen zusammen:

- dem linearen, doppelsträngigen DNA-Genom,
- einem ikosaedrischen Kapsid, welches das Genom umgibt,
- dem Tegument - einer Proteinmatrix, welche das Nukleokapsid umhüllt und das Kapsid mit der Hülle des Virus verbindet,
- der Lipidhülle, die aus der Wirtszellmembran und darin eingelagerten, viralen Hüllproteinen gebildet wird.

Die so entstandenen Viruspartikel weisen eine Größe von 150 bis 200 nm auf (Mettenleiter, 2002; Pellet & Roizman, 2013).

Als behüllte Viren infizieren Herpesviren ihre Wirtszelle durch Attachment an der Oberfläche der Zelle und anschließende Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran, wodurch das Nukleokapsid ins Zytoplasma gelangt und zur Kernmembran transportiert wird. Einige der

ebenfalls freigesetzten Tegumentproteine beeinflussen den Metabolismus der Wirtszelle und schaffen so die Virusreplikation begünstigende Bedingungen.

Am Zellkern wird die virale DNA aus dem Nukleokapsid entlassen und wandert durch die Kernporen ins Innere des Zellkerns, wo Transkription und Replikation des Virusgenoms vonstattengehen.

Nach erfolgter Replikation wird die neu synthetisierte DNA in Nukleokapside eingeschlossen und erhält eine erste Hülle beim Durchwandern der inneren Kernmembran. Durch deren sich direkt daran anschließende Fusion mit der äußeren Kernmembran werden die dann wieder unbehüllten Nukleokapside ins Zytoplasma entlassen.

Im trans-Golgi-Bereich folgt die Anlagerung der Tegumentproteine an die Kapside und deren Umhüllung mit einer Membran, die vom Golgi-Apparat abgeleitet ist und in welche bereits die viralen Glykoproteine eingelagert sind. Die Virionen in ihrer endgültigen Form werden unter Zelllyse oder per Exozytose aus der Wirtszelle freigesetzt.

2.2 Das *Gallide Alphaherpesvirus 1* (GaHV-1, Virus der Infektiösen Laryngotracheitis, ILTV)

Das Virus der Infektiösen Laryngotracheitis zählt innerhalb der Ordnung Herpesvirales zur Familie der Herpesviridae und zu deren Subfamilie, den Alphaherpesvirinae (Davison, 2010). Es stellt einen der beiden Vertreter des Genus Iltovirus dar, zu dem neben dem ILTV auch das Psittazide Herpesvirus 1 (PsHV-1) gehört (Thureen & Keeler, 2006).

Im Gegensatz dazu werden andere aviäre Herpesviren – sowohl die Erreger der wirtschaftlich relevanten und in einzelnen Ländern tierseuchenrechtlich reglementierten Marekschen Krankheit (Gallides Herpesvirus 2 und 3, MDV) als auch das Herpesvirus der Puten (Meleagrid herpesvirus 1, HVT), der Taube (Columbid herpesvirus 1) und der Ente (Anatid herpesvirus 1) – in der Familie der Herpesviridae dem Genus Mardivirus zugeordnet (Davison, 2010, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Aviäre Beta- und Gammaherpesviren wurden bislang nicht klassifiziert.

Das ILTV weist die für Herpesvirionen typische Morphologie auf. Die Größe der Virionen variiert zwischen 200 und 350 nm, abhängig von der Menge der inkorporierten Tegumentproteine, welche bei ILTV teilweise recht stark ausgeprägt ist (Cruickshank et al., 1963; Granzow et al., 2001; Watrach, Hanson et al., 1963). Replikation und Morphogenese der

Virionen scheint sich ebenfalls nicht von den Vorgängen bei anderen Herpesviren zu unterscheiden.

Dagegen lässt sich in Zellkultur nach Infektion mit ILTV häufig die Bildung tubulärer Strukturen unbekannter Funktion und großer, zytoplasmatischer Vakuolen, in denen zahlreiche Virionen eingeschlossen sind, beobachten. (Granzow et al., 2001; Mettenleiter, 2002).

Das Genom des ILTV besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA mit einer Länge von etwa 150 000 Basenpaaren und einem G/C-Anteil zwischen 44 % und 48,2 %, abhängig vom untersuchten Stamm (Fuchs et al., 2007; Johnson et al., 1991).

Seine Unterteilung in zwei einmalig vorhandenen Genomregionen (unique long region, U_L und unique short region, U_S) und aus den in Wiederholungen vorliegenden Sequenzen innerhalb des Genoms (internal repeats, IR) und an den Genomenden (terminal repeats, TR), welche die U_S-Region flankieren, entspricht dem sogenannten Typ D der Organisation des Herpesvirusgenoms (Fuchs et al., 2007; Leib et al., 1987).

Im Gegensatz zum Herpes-simplex-Virus, von dem diese Nomenklatur abgeleitet wurde, liegt die U_L-Region von ILTV in umgekehrter Orientierung vor. Darüber hinaus enthält das Genom von ILTV eine weitere Inversion, welche den Leserahmen für die Gene U_L22 bis U_L44 umfasst. In dieser Hinsicht ähnelt es dem Genom des Pseudorabies-Virus (PrV) (Ben-Porat et al., 1983; Ziemann et al., 1998) und des PsHV-1. Die Übereinstimmungen mit PsHV-1 erstrecken sich darüber hinaus auf die Translokation des Gens U_L47 in die U_S-Region und fünf, für diese beiden Viren spezifische, offene Leserahmen (Open reading frames, ORF) in der U_L-Region (Thureen & Keeler, 2006)

2.3 Infektiöse Laryngotracheitis (ILT)

Bei der Infektiösen Laryngotracheitis handelt es sich um eine Infektionskrankheit der Atemwege von Hühnern. Die Krankheit hat wegen der teilweise hohen Letalität und den Einbußen der Legeleistung von Hennen und der Gewichtszunahme von Broilern große wirtschaftliche Bedeutung.

Für die Infektion empfänglich sind Hühner aller Altersstufen, wobei die frühesten Ausbrüche ab einem Alter von drei Wochen beschrieben wurden (Dufour-Zavala, 2008). Darüber hinaus können Fasane, Pfaue und Puten erkranken (Crawshaw & Boycott, 1982; Portz et al., 2008; Winterfield & So, 1968).

Die Ansteckung erfolgt über den Respirationstrakt, aber auch oral oder konjunktival. Eine vertikale Übertragung über das Ei kommt nicht vor. Ausscheidungswege sind über das Sekret von Konjunktiven und Trachea, teilweise auch über den Kot. Überträger sind meist akut erkrankte Tiere, jedoch kann die Ansteckung auch durch latent infizierte Tiere erfolgen, in denen das Virus persistiert und nach Reaktivierung erneut ausgeschieden wird (Hughes et al., 1991). Eine weitere Infektionsquelle können attenuierte Lebendimpfstoffe sein, die ebenfalls latent in geimpften Tieren verbleiben können (Bagust, 1986). Darüber hinaus können attenuierte Lebendimpfstoffe durch Reversion oder Rekombination wieder Virulenz erlangen. Auch die indirekte Verbreitung durch kontaminierte Gegenstände, Einstreu oder Personen und unzureichende Hygiene ist möglich (Dufour-Zavala, 2008).

Die klinischen Symptome können stark variieren: Milde Verlaufsformen äußern sich hauptsächlich durch eine verminderte Legeleistung, die geringgradige Entzündung von Trachea oder Konjunktiven und einen schlechten Allgemeinzustand, wohingegen schwere Formen letal verlaufen können. Sie sind gekennzeichnet durch erschwerte Atmung, blutigen Auswurf und eine eitrig-katarrhalische Laryngotracheitis und Konjunktivitis (Swayne et al., 2013). Neben Oesophagitis, Sinusitis und Bronchitis können sich die Entzündungssymptome bis in den tiefen Respirationstrakt ausweiten und zu Bronchopneumonie oder Aerosacculitis führen. Tod durch Ersticken ist möglich (Mayr & Kaaden, 2007).

Die Inkubationszeit beträgt üblicherweise sechs bis 14 Tage. Je nach Verlauf können erkrankte Tiere innerhalb von zehn bis 14 Tagen genesen (Jordan, 1966).

Die Replikation des Virus ist auf das respiratorische Gewebe beschränkt. Wenige Tage nach der Infektion tritt der Verlust von Becherzellen und die Bildung von Synzytien auf, Entzündungszellen wandern ins betroffene Gewebe ein und die Epithelien von Atemwegen und Konjunktiven werden ödematös. Nur während des Anfangsstadiums der Krankheit lassen sich die pathognomonischen, intranukleären Einschlusskörperchen beobachten. Durch den lytischen Zellzyklus der Herpesviren treten bei schwerem Verlauf der Krankheit Nekrosen und Desquamationen der Epithelien auf, die schließlich in Hämorrhagien und diphtheroiden Veränderungen resultieren können (Swayne et al., 2013).

Nach Verstreichen der akuten Phase der Erkrankung wird eine lebenslange Latenz in respiratorischen Geweben etabliert. Des Weiteren konnten latente Viren im Trigeminalganglion nachgewiesen werden (Bagust, 1986; Bagust & Johnson, 1995; Coppo et al., 2013; Williams et al., 1992).

2.3.1 Epidemiologie

In der Schweiz zählt die Infektiöse Laryngotracheitis zu den zu bekämpfenden Seuchen und unterliegt daher der Meldepflicht. In den vergangenen Dekaden kam es zu vereinzelt Fällen, von denen die meisten bei Rassegeflügel in Hobbyhaltungen auftraten. Der letzte Ausbruch in einem kommerziellen Geflügelbetrieb war 2017 im Kanton Thurgau in einem Betrieb mit rund 9000 Junghennen (persönliche Kommunikation: Nationales Referenzzentrum für Geflügel- und Kaninchenkrankheiten, Zürich). Im Seuchenfall wird eine Sperre über den betroffenen Betrieb verhängt und alle Tiere werden gekeult (Eidgenössisches Departement des Innern, 2013, 2016; *Schweizer Tierseuchenverordnung*, 2017).

Die Ansteckungsquelle in Geflügelbetrieben weltweit sind häufig Hühner aus Hobbyhaltungen, da diese Tiere nach überstandener Infektion latente Träger des Virus sind und die erneute Virusausscheidung nach Stresseinwirkung möglich ist (Dufour-Zavala, 2008; Johnson et al., 1991) wie auch die Verschleppung, beispielsweise durch unsachgemäß gereinigte Geräte, Kleidung oder Transportkisten.

Die enge Korrelation zwischen den bei Ausbrüchen dominierenden Erregerstämmen und extensiv verwendeten, attenuierten Lebendimpfstoffen führte zur Bezeichnung als „Impfbedingte Laryngotracheitis“ („Vaccinal Laryngotracheitis“, Dufour-Zavala, 2008), deren Ausbreitung sich weitgehend mit den Regionen intensiver Geflügelproduktion deckt. Allerdings wurde das Vorkommen infektiöser Stämme, die den Impfviren ähneln, auch in Ländern nachgewiesen, die deren Verwendung nicht erlauben (Menendez et al., 2014).

Neben der Verwendung verbesserter Impfstoffe bleiben Biosicherheitsmaßnahmen die tragende Säule zur Vorbeugung von Infektionen. Unter Anwendung strikter Reinigungs- und Desinfektionsmethoden und durch Quarantäne oder verlängerte Leerzeiten zwischen den Durchgängen kann der Kontakt zwischen geimpften oder genesenen Tieren mit immunologisch naiven Tieren weitgehend verhindert werden (Chin et al., 2009).

2.3.2 Prävention und Kontrolle von ILT

Bereits kurze Zeit nach der Erstbeschreibung von ILT im Jahre 1925 durch May & Tittler (Cover, 1996) wurden erste Impfversuche unternommen. Dabei wurde infektiöses Virus in die Kloake appliziert. Somit gilt ILT als die erste, aviäre, virale Erkrankung, gegen die eine Impfung entwickelt wurde.

Die Methode, das Virus im Hühnerei zu vermehren (Brandly, 1935), ermöglichte es, die Virulenz infektiöser Feldstämme durch wiederholte Passagen in Hühnerembryonen zu verringern, wodurch attenuierte Lebendimpfstoffe erhältlich wurden, die höhere Sicherheit und gesteigerte Effizienz bieten. Von diesen sogenannten CEO-Vakzinen (chicken embryo origin, Ursprung im Hühnerembryo; García, 2017; Samberg et al., 1971) sind die Stämme Cover, Hudson, Samberg, SA2, A20 und Serva noch heutzutage in Gebrauch (Menendez et al., 2014).

Im Jahr 1964 gelang die Attenuierung von infektiösem Virus durch Passagen in primären Hühnerzellen, aus der die Impfstoffgruppe der TCO-Vakzine (tissue culture origin, Ursprung in der Zellkultur) resultierte (Gelenczei & Marty, 1964).

Obgleich CEO- und TCO-Lebendimpfstoffe einen guten Schutz vor Infektion mit ILT vermitteln können und auch gegenwärtig den weltweit noch größten Teil an ILTV-Impfstoffen ausmachen (Menendez et al., 2014), führten ihre gewichtigen Nachteile (vgl. Kapitel „Bewertung gegenwärtig erhältlicher ILT-Impfstoffklassen“) zur Entwicklung von zwei weiteren Klassen von Impfstoffen gegen ILT.

Vektorimpfstoffe basieren auf der Verwendung von rekombinanten Viren zur Expression immunogen wirkender Antigene. Kommerziell erhältlich sind zur Zeit ein Hühnerpockenvirus (FPV, fowl pox virus), das die Gene für das Glykoprotein B (gB) und U_L32 trägt (Vectormune[®] FP-LT; Ceva Animal Health, Lenexa, KS, USA) und zur intrakutanen Applikation im Alter von einer Woche oder zur Impfung *in ovo* zugelassen ist (Davison et al., 2006), sowie ein zweiter Impfstoff, dem ein Putenherpesvirus (HVT, herpes virus of turkey) zugrunde liegt, und das als Vektor für die Glykoproteine I und D fungiert (Innovax ILT[®]; Intervet International B.V., Whitehouse Station, NJ, USA). Dessen Verabreichung erfolgt subkutan am ersten Lebenstag oder *in ovo*. Ebenfalls auf HVT basiert Vectormune[®] HVT-LT (Ceva Biomune, Lenexa, KS, USA) zur *in-ovo*- oder subkutanen Applikation am ersten Lebenstag (García, 2017).

Den dritten Schwerpunkt neuer Impfstoffe gegen ILT bilden ILTV-Deletionsmutanten. Dabei werden Gene deletiert, die zu Infektiosität und/oder Pathogenität des Virus beitragen. Die Entfernung der ILTV Gene U_L0, sowie U_L47 (Tegumentprotein), der Gene für die Thymidinkinase (TK) oder die Glykoproteine C (gC), G (gG) oder J (gJ) führten zu einer verminderten Virulenz *in vivo* und dem Schutz des geimpften Tieres vor Krankheitssymptomen (Fuchs et al., 2005; Helferich et al., 2007; Pavlova et al., 2010; Schnitzlein et al., 1995; Veits et al., 2003; Devlin et al., 2006).

2.3.3 Bewertung gegenwärtig erhältlicher ILT-Impfstoffklassen

Zur Impfung gegen ILT ist derzeit der Gebrauch attenuierter Lebendimpfstoffe weitverbreitet. Durch diese kann ein solider Schutz hervorgerufen werden. Darüber hinaus ist deren Applikation über das Trinkwasser und per Sprayimpfung möglich, was die gleichzeitige Impfung vieler Tiere erlaubt.

Allerdings verfügen attenuierte Lebendimpfstoffe über eine – unterschiedlich stark ausgeprägte – Restvirulenz, sind zur Replikation fähig und können von Tier zu Tier übertragen werden. Auch haben die attenuierten Viren die Fähigkeit zur Latenz, was zu einer Reaktivierung und erneuten Virusausscheidung führen kann (Coppo, et al., 2013; Ou & Giambrone, 2012).

Der Kontakt von ungeimpften Tieren mit reaktivierten Impfviren – der insbesondere durch die ungleichmäßige Impfstoffapplikation per Trinkwasser gegeben ist – führt aber nicht notwendigerweise ebenfalls zum Schutz vor Infektion (Rodríguez-Avila et al., 2008), sondern birgt vielmehr die Gefahr der Reversion der attenuierten Viren zu infektiösen Viren durch wiederholte *in-vivo*-Passagen (Guy et al., 1991). So liegen vielen Krankheitsausbrüchen CEO-Impfstämme zugrunde (Oldoni & García, 2007) und viele der heutigen Feldisolate sind weltweit kaum oder nicht unterscheidbar von den Impfviren (Chang et al., 1997; Graham et al., 2000; Kirkpatrick et al., 2006; Moreno et al., 2010; Neff et al., 2008).

Die gleichzeitige Verwendung der Impfstämme SA2, A20 und des europäischen CEO-Stammes Serva führte in Australien zu Rekombinationen unter diesen Impfviren, woraus neue Erreger resultierten, die sogar eine höhere Virulenz und Fitnessvorteile im Vergleich zu den ursprünglichen Viren aufwiesen und zu schweren Krankheitsausbrüchen führten (Agnew-Crumpton et al., 2016; Lee et al., 2012).

Der Differenzierung zwischen den erwähnten Viren liegen Sequenzanalysen mittels PCR (Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion) gefolgt von RFLP (Restriction fragment length polymorphism, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) zugrunde, da alle ILTV-Stämme einem Serotyp angehören. Daher sind sie nicht anhand ihrer Oberflächenantigene unterscheidbar (Swayne et al., 2013). Somit sind serologische Methoden zur Abgrenzung von Impf- und Feldvirus nicht geeignet und die Seuchenüberwachung gemäß dem DIVA-Prinzip (*D*ifferentiating *I*nfected from *V*accinated *A*nimals, Unterscheidung geimpfter von infizierten Tieren) daher ungleich erschwert.

Diese Einschränkung wird durch die Verwendung rekombinanter Vektorvakzine beseitigt, da diese nur ausgewählte Antigene des Virus exprimieren. Auch sind die zugrundeliegenden Viren apathogen und daher unfähig, Virulenz zurückzuerlangen, mit Feldviren zu rekombinieren oder einen Latenzstatus aufzubauen (Davison et al., 2006; Menendez et al., 2014). Sie stellen daher eine vergleichsweise sichere Impfmethode dar.

Die Nachteile der Vektorimpfstoffe bestehen darin, dass die generierte Immunantwort, unabhängig von der Verabreichungsmethode, nicht dasselbe Maß an Schutz vor Infektion bietet wie die Verwendung von TCO- und CEO-Vakzinen (Vagnozzi et al., 2012). Die kombinierte Verwendung verschiedener ILTV-Vektorimpfstoffe kann den Schutz auf ein den TCO-Vakzinen vergleichbares Niveau erhöhen (Coppo, et al., 2013). Jedoch kann die Replikation von ILTV in der Trachea durch Vektorimpfstoffe nicht vollständig gehemmt werden, sondern wird nur reduziert und zeitlich verkürzt (Johnson et al., 2010; Vagnozzi et al., 2012). Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit der fehlenden Replikation der Vektoren im respiratorischen Gewebe. Auch die Frage, ob der Aufbau von Latenz durch das infektiöse ILTV auf diese Art unterbunden wird, ist bislang ungeklärt (Coppo, et al., 2013).

ILTV-Deletionsmutanten schließlich bieten Schutz gegen die experimentelle Infektion mit ILTV und erlauben die Unterscheidung zwischen geimpften und infizierten Tieren mittels serologischer Methoden (Fuchs et al., 2005; Shil et al., 2012). Trotz der Deletion bestimmter Gene sind diese attenuierten Viren noch zur Replikation fähig, allerdings führt dies nur zu niedrigen Titern, was eine Herausforderung bei der kommerziellen Impfstoffproduktion in großem Maßstab sein kann (Coppo, et al., 2013). Ihre Fähigkeit, die virale Replikation im respiratorischen Gewebe zu verhindern, unterscheidet sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Mutation. Bei der Deletion von gG wurde eine verminderte, diesbezügliche Wirkung nach der Applikation *in ovo* (Coppo et al., 2011; Devlin et al., 2009; Devlin et al., 2007; Legione et al., 2012) beschrieben.

Somit wird keiner der bislang entwickelten Impfstoffe allen Anforderungen an ein ideales ILTV-Vakzin gerecht. Ein solches sollte einen gleichmäßigen und sicheren Schutz bieten und darüber hinaus zur Massenapplikation geeignet sein. Ein weiterer Vorteil wäre die kosteneffiziente und technisch leichte Herstellung in großem Maßstab. Der Impfstoff sollte sowohl selbst keine Latenz aufbauen, als auch das Feldvirus am Aufbau von Latenz hindern. Er sollte nicht von Tier zu Tier übertragen werden und die virale Replikation, Ausscheidung

und Verbreitung verhindern. Komplettiert würden diese Vorzüge durch die Anwendbarkeit serologischer DIVA-Kontrollstrategien (Coppo, et al., 2013).

2.4 ILTV-Glykoproteine

Bei Herpesviren zählen Glykoproteine zu den Antigenen mit dem höchsten immunogenen Potential. Sie sind in der Lage, sowohl humorale als auch zelluläre Immunreaktionen hervorzurufen. Darüber hinaus vermittelt die Impfung mit aufgereinigten Glykoproteinen wie auch mit Glykoprotein exprimierenden Vektorvakzinen eine schützende Immunantwort gegen die Infektion mit ILTV (York & Fahey, 1990; vgl. Kapitel „Prävention und Kontrolle von ILTV“).

Bei Herpes-Simplex-Viren und den tierpathogenen α -Herpesviren, zu denen auch das ILTV-Virus zählt, wurden zwölf verschiedene Glykoproteine identifiziert (Thureen & Keeler, 2006). Die meisten darunter sind Strukturproteine, welche in die virale Hüllmembran eingelagert sind (York et al., 1990). In dieser Position vermitteln sie die spezifische Bindung der viralen Partikel an Rezeptoren auf der zellulären Membran und erfüllen somit eine wichtige Aufgabe bei der Adsorption und der Aufnahme der Viren in die Wirtszelle (Kühn et al., 1990). Sie sind daher ein entscheidender Faktor für die Pathogenität des Virus.

Die Nomenklatur der glykosylierten Proteine orientiert sich an der Reihenfolge ihrer Entdeckung im Herpes-Simplex-Virus (Fuchs et al., 2007; Pavlova et al., 2013). Sie werden demzufolge als gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM und gN bezeichnet. Die ursprünglich mitaufgeführten Proteine gA und gF wurden später als Spalt- oder Vorläuferprodukte anderer Glykoproteine identifiziert und daher aus der Auflistung entfernt. Eine alternative Namensgebung der Glykoproteine verweist auf deren Anordnung im Genom (vgl. Kapitel „Das *Gallide Alphaherpesvirus 1* (GaHV-1, Virus der Infektiösen Laryngotracheitis, ILTV)“). Die Glykoproteine werden folglich nach ihrem Genomsegment als U_L oder U_S und zur Angabe ihrer Lage im Segment von links nach rechts durchnummeriert (Modrow et al., 2010).

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit genutzten Glykoproteine gB, gC, gD und gG näher beschrieben.

2.4.1 Glykoprotein B (gB, U_L 27)

Das Glykoprotein B gilt als das am höchsten konservierte Strukturglykoprotein der Herpesviren (Pereira, 1994). Ein entsprechendes Protein wurde bislang in jedem Herpesvirus nachgewiesen (Poulsen & Keeler, 1997). Es zählt zu den Hauptimmunogenen des ILTV (Tong et al., 2001).

Nach der Synthese seines 110 kDa großen Vorläuferproteins im Endoplasmatischen Reticulum, wird dieses im Golgi-Apparat durch Glykosylierungen und proteolytische Spaltungen modifiziert. Es entsteht ein durch Disulfidbrücken verbundenes Homodimer, das eine molekulare Masse von 116 kDa aufweist. Entsprechende posttranslationale Prozessierungen wurden auch bei den gB-Homologen anderer Herpesviren nachgewiesen, wohingegen das Glykoprotein B des Herpes-Simplex-Virus nicht gespalten wird (Akhtar & Shukla, 2009; Galdiero et al., 2008). Die prozessierte Form von Glykoprotein B wird als Transmembranprotein in die Virushülle eingebettet (Griffin, 1991). Seine entscheidende Funktion erfüllt das Glykoprotein beim Eintritt des Virus in die Wirtszelle, sowie bei dessen Ausbreitung direkt von Zelle zu Zelle.

Neben der Rezeptor abhängigen Endozytose und der anschließenden Fusion zwischen Virusmembran und Endosomenmembran infizieren behüllte Viren wie das Herpesvirus Zellen durch Adsorption an die Zellmembran und der anschließenden Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran, wodurch die Nukleokapside und Tegumentproteine ins Zytoplasma gelangen. Der Anstoß hierfür wird von Glykoproteinen der Virushülle gegeben. Zwar ist gB nicht essentiell für die Bindung an die Wirtszelle, jedoch unabhömmlich für deren Penetration (Cai et al., 1988). In vielen Herpesviren wird die initiale Bindung an die Zelloberfläche durch Interaktion zwischen Glykoprotein C oder B mit Heparansulfat vermittelt (Cheshenko & Herold, 2002); einem Molekül, welches auf den meisten eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Im Gegensatz zu anderen Herpesviren verfügen die Glykoproteine B und C von ILTV jedoch nicht über eine Heparinbindungsdomäne. Die primäre Adsorption erfolgt daher wahrscheinlich ohne Bindung an Heparan- oder Chondroitinsulfatproteoglykane (Kingsley & Keeler, 1999) oder wird über ein anderes Glykoprotein vermittelt.

Die anschließende Penetration der Zellmembran erfordert die Anwesenheit der vier Glykoproteine gB, gD, gH und gL (Spear et al., 2000). Doch obwohl gB viele Charakteristika viraler Fusionsproteine aufweist, ist seine genaue Funktionsweise bislang noch unbekannt (Akhtar & Shukla, 2009; Galdiero et al., 2008). Daneben umfasst auch die Ausbreitung des Virus durch direkte Übertragung von Zelle zu Zelle einen vergleichbaren Fusionsschritt und

bedarf derselben vier Glykoproteine (Turner et al., 1998; Uchida et al., 2013).

Als wichtiges Ziel zellvermittelter und humoraler Immunreaktionen, wurde gB in verschiedenen Impfansätzen gegen die Infektiöse Laryngotracheitis bereits getestet. Sowohl aufgereinigte Glykoproteine (York & Fahey, 1991), als auch gB exprimierende, rekombinante Vektoren kamen zum Einsatz (Basavarajappa et al., 2014; Chen et al., 2011; Sun et al., 2008; Tong et al., 2001; Yu et al., 2017; Zhao et al., 2014). Diese Impfstoffe sind teilweise bereits kommerziell erhältlich (Davison et al., 2006; Johnson et al., 2010; Vagnozzi et al., 2012). Allerdings scheint deren Effizienz hinsichtlich der Elimination infektiöser Viren im Vergleich zu Lebendimpfstoffen ungleich geringer zu sein (Vagnozzi et al., 2012; Zhao et al., 2014).

2.4.2 Glykoprotein C (gC, U_L 44)

Auch Glykoprotein C zählt zu den Strukturproteinen der Hülle der Herpesviren (Kingsley, Hazel, & Keeler, 1994) und ist – neben Glykoprotein J – eines der Hauptimmunogene des ILTV im Bezug auf die Induktion von Antikörpern (Veits et al., 2003).

Zwar ist die Lokalisation des Gens für gC unter den Herpesviren konserviert (Fuchs et al., 2007), jedoch gilt dies nicht für die Aminosäuresequenz des Glykoproteins, die nur geringe Übereinstimmungen innerhalb der verschiedenen Vertretern der Herpesviren aufweist (Kingsley et al., 1994). So verfügt ILTV-gC auch nicht über die positiv geladene, extrazellulär lokalisierte Domäne (Kingsley et al., 1994), welche bei vielen α -Herpesviren die initiale Bindung des Virus an Heparansulfatproteoglykane auf der Zelloberfläche vermittelt (Cardin & Weintraub, 1989; Kingsley et al., 1994; Osterrieder, 1999) und stabilisierend auf die folgenden Fusionsschritte wirkt (Spear et al., 2000). So kann die Anlagerung von gC an Heparansulfat beim Herpes-Simplex-Virus durch die Bindung von Glykoprotein B – eigentlich einer Komponente des Membranfusionskomplexes – ersetzt werden (Herold et al., 1994) oder die primäre Adsorption erfolgt völlig unabhängig von der Anlagerung an Heparansulfat. Dies ist der Fall beim ILTV, da weder gB noch gC dieses Virus über eine entsprechende Bindungsdomäne verfügen (Kingsley & Keeler, 1999).

ILTV-gC ist nicht essentiell für die Replikation. Es hat keinen Einfluss auf die Höhe des viralen Titers und die Infektiosität des Virus. Die Deletion von gC stellt somit keine letale Mutation dar und resultiert neben einer geringen Reduktion des Plaque-Durchmessers *in vitro*, in einer nur leicht verzögerten Penetration der Wirtszellen, was auf eine akzessorische Funktion beim Zelleintritt hinweist (Mettenleiter, 1994; Pavlova et al., 2010). Die Infektion *in vivo* resultiert

in einer leichten Attenuierung hinsichtlich der klinischen Symptome. Im Gegensatz dazu tritt beim Fehlen von gC eine Verstärkung der angeborenen und der erworbenen Immunantwort auf (Pavlova et al., 2010). Diese Beobachtung weist auf eine weitere Funktion hin, welche für gC-Homologe anderer α -Herpesviren nachgewiesen wurde: die Beteiligung von gC an Immunevasionsmechanismen. Hierbei bindet gC an die zentralen Komplementmoleküle C3 und C3b und blockiert die Anlagerung von C5 und Properdin. Auf diese Weise wird die Komplement vermittelte Virusneutralisation und die Lyse infizierter Zellen verhindert (Awasthi et al., 2009; Lubinski et al., 1998). Allerdings ist gC, wie auch gE - ein weiteres ILTV-Glykoprotein mit immunmodulatorischer Wirkung -, für die humorale Immunantwort zugänglich, da beide auf der Virusoberfläche lokalisiert sind. Sie stellen somit potentielle Impfstoffkomponenten dar (Awasthi et al., 2009).

Neben der geschilderten Funktion wird die Beteiligung von gC an der Freisetzung von Virionen aus der Zelle und bei der direkten Übertragung von Zelle zu Zelle diskutiert (Jarosinski et al., 2007; Osterrieder, 1999).

2.4.3 Glykoprotein D (gD, U_s 6)

Glykoprotein D, das beim ILTV eine molekulare Masse von 70 kDa aufweist, wird nur innerhalb der Subfamilie der α -Herpesviren, jedoch nicht von den β - und γ -Herpesviren exprimiert. Eine Ausnahme hiervon stellen die stark zellassoziierten α -Herpesviren MDV und Varicella-Zoster-Virus dar, welche dieses Protein *in vitro* ebenfalls nicht exprimieren (Davison, 2010; Tan et al., 2001).

Glykoprotein D übernimmt die wesentliche Rolle bei der Erkennung empfänglicher Wirtszellen. Seine Interaktion mit spezifischen Rezeptoren auf der Zellmembran bestimmt darüber, ob ein Zelltyp von ILTV infiziert werden kann. Die Bindung von gD an seinen Rezeptor ist die Voraussetzung für die Aktivierung des viralen Fusionkomplexes, bestehend aus gB, gD und dem Heterodimer gH/gL, was die Fusion der viralen mit der zellulären Membran und den anschließenden Übertritt von Nukleokapsid und Tegumentproteinen ins Zellinnere ermöglicht (Akhtar & Shukla, 2009; Spear, 2004; Spear et al., 2000).

Die Bindung an jeden der bislang identifizierten gD-Rezeptoren setzt eine Änderung der Konformation des ungebundenen gD voraus (Spear et al., 2006). Eine weitere Konformationsänderung ermöglicht die Präsentation des membrannahen Anteils von gD, was die Membranfusion durch gH/gL und gB einleitet (Lazear et al., 2011; Spear et al., 2006).

Als Antigen, das sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort hervorruft, wird gD, kombiniert mit gI, in einem auf Putenherpesviren basierenden, rekombinanten Vektorvakzin bereits kommerziell eingesetzt (Gimeno et al., 2011; Johnson et al., 2010; Vagnozzi et al., 2012). Des Weiteren wurde sein Einsatz in rekombinantem NDV-Vektorimpfstoff getestet (Newcastle Disease Virus, Virus der Newcastle-Krankheit; Basavarajappa et al., 2014; Yu et al., 2017; Zhao et al., 2014).

2.4.4 Glykoprotein G (gG, U_s4)

Beim Glykoprotein G handelt es sich um eine immunogen wirkende Komponente des ILT-Virus, welche innerhalb der meisten Vertreter der α -Herpesviren konserviert ist (Kongsuwan et al., 1993).

Anders als der Großteil der ILTV-Glykoproteine zählt Glykoprotein G jedoch nicht zu den Strukturproteinen der viralen Hüllmembran (Pereira, 1994; Spear, 1993), sondern wird von infizierten Zellen sezerniert (Bryant et al., 2003) und wirkt als Virulenzfaktor mit immunmodulatorischer Funktion (Devlin et al., 2006). Diese besteht darin, ein großes Spektrum von Chemokinen des infizierten Organismus binden zu können und daher die Interaktion dieser Chemokine mit ihren Rezeptoren auf den Wirtszellen zu unterbinden. Dadurch wird auch deren Aufgabe bei der Abwehr von Viren verhindert, die darin besteht, Leukozyten während der frühen Phase der Infektion per Chemotaxis zu den befallenen Geweben zu locken.

In-vivo-Studien mit gG-Deletionsmutanten des ILT-Virus resultierten neben einer Attenuierung der klinischen Symptome in veränderten Leukozytenpopulationen im Trachealgewebe zugunsten der Anzahl der Heterophilen, der CD4⁺- und der CD8⁺-T-Lymphozyten einerseits und verringerten B-Lymphozytenzahlen, sowie einer Verminderung der Serumantikörpermenge andererseits. Somit zeichnet sich das Glykoprotein G für einen Immunevasionsmechanismus verantwortlich, der die Immunantwort des Wirtes weg von der wirksamen, zellulären und hin zur antikörpervermittelten Abwehr dirigiert, und schafft so Bedingungen, welche die Ausbreitung des Virus begünstigen (Devlin et al., 2009).

Neben ILTV gG wurde ein solches virales Chemokin-bindendes Protein (viral chemokine binding protein, vCKBP) auch in Vertretern der α -Herpesviren von Säugetieren, wie beispielsweise EHV-1 und EHV-3, BHV-1 und BHV-5 (Equines bzw. Bovines Herpesvirus), sowie dem feline Herpesvirus 1 nachgewiesen (Bryant et al., 2003), wohingegen das Glykoprotein G von Herpes-simplex-Virus 1 und 2 nicht die geschilderte Funktion erfüllt.

Innerhalb der α -Herpesviren ist gG zwar das einzig bislang beschriebene vCKBP, eine vergleichbare Eigenschaft ist jedoch auch bei Poxviren (Alcami, 2003; Alcamí, 2000) und dem murinen γ -Herpesvirus 68 (Parry et al., 2000; van Berkel et al., 2000) bekannt.

Im Gegensatz zu vielen anderen Glykoproteinen von Herpesviren scheint gG keinen Effekt auf die Bindung und Aufnahme des Virus in die Zelle zu haben (Sun & Zhang, 2005). Ebenso hat es keine Funktion bei der Replikation (Pavlova et al., 2010) und dem Aufbau des Latenzstatus (Devlin et al., 2006). Hingegen erfüllt gG neben seinen Eigenschaften als vCKBP regulatorische Funktionen während der frühen Phase der Infektion (Mahmoudian et al., 2013).

2.5 Virus-like particles (VLPs, Virus-ähnliche Teilchen)

Vor 1969 beruhten sämtliche, antiviralen Impfstoffe auf inaktivierten oder attenuierten Viren oder machten sich die Etablierung einer Kreuzimmunität durch die Verabreichung nahe verwandter, nicht pathogener Viren zunutze (Ludwig & Wagner, 2007). Dabei bestand jedoch stets die Gefahr der Entstehung pathogener Erreger durch Reversion, Rekombination oder Mutation der Impfstämme.

Inzwischen ermöglichen jedoch die genaue Kenntnis viraler Strukturen und molekulare Arbeitstechniken, den Einsatz von „Virus-ähnlichen Teilchen“ (Virus-like particles, VLPs) zur Etablierung einer schützenden Immunantwort. VLPs entstehen durch spontane Zusammenlagerung viraler Kapsidproteine nach deren Expression in Kultursystemen (Garcea & Gissmann, 2004) oder *in vitro*. Sie ähneln daher den zugrundeliegenden Viren hinsichtlich ihrer Struktur, aber auch in ihrer Wirkung auf das Immunsystem. Im Gegensatz zu den eingangs erwähnten Impfstoffen beinhalten VLPs dagegen keinerlei genetisches Material, so dass sie nicht replikationsfähig und damit auch nicht infektiös sind. Dadurch bieten VLPs ein hohes Maß an Sicherheit (Crisci et al., 2012; Grgacic & Anderson, 2006; Ludwig & Wagner, 2007).

Entsprechend der Viren, von denen sie abgeleitet sind, lassen sich VLPs in unbehüllte Partikel, die sich aus einem oder mehreren verschiedenen Kapsidproteinen zusammensetzen, und behüllte Strukturen unterteilen. Die Letzteren verfügen neben dem viralen Kapsid über eine Lipidhülle, die durch Budding an der Wirtszelle entsteht und in die virale Hüllproteine eingelagert sein können. Darüber hinaus können VLPs als Sammelplattformen zur Präsentation fremder Epitope genutzt werden und ermöglichen auf diese Weise, eine Immunreaktion gegen Strukturen mit eigentlich geringem antigenem Potential hervorzurufen (Deml et al., 2005). Hierfür eignet sich einerseits die Fusion fremder Antigene an die VLP-Sequenz und deren

anschließende, gemeinsame Expression oder andererseits die chemische Bindung der Epitope an die repetitiven Einheiten bereits bestehender VLPs.

Auf VLPs basierende Impfstoffe gegen Hepatitis B und E, sowie gegen das humane Papillomavirus und gegen das porcine Circovirus 2 sind bereits zugelassen und kommerziell erhältlich (Garland et al., 2007; Liu et al., 2013; Monie et al., 2008; Shi et al., 2007).

Anders als die Attenuierung eines Pathogens, das häufig auch die Abschwächung seines immunogenen Potentials bedingt (Bachmann & Jennings, 2010), stellen VLPs keinerlei Risiko im Hinblick auf die Infektiosität dar und rufen dennoch starke Immunantworten hervor: Durch die Präsentation von Epitopen in hoher Anzahl und großer Dichte, sowie durch die Anordnung der Virusproteine wird die typische, ikosaedrische oder kubische Morphologie von Viren imitiert (Bachmann & Jennings, 2010). Dies entspricht einem Pathogen-assoziierten Muster (pathogen associated molecular pattern, PAMP), welches die angeborene Immunantwort des Wirtes durch die Bindung an Toll-like-Rezeptoren oder andere Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) der Wirtszelle aktiviert (Plummer & Manchester, 2011). Somit fungieren VLPs als ein natürliches Adjuvans.

Daneben werden auch Antigen-präsentierende Zellen (antigen presenting cells, APCs) durch diese Muster zur Aufnahme der Antigene stimuliert, was wiederum zur Aktivierung des erworbenen Immunsystems führt. Hierzu tragen außerdem die partikuläre Struktur von VLPs – im Gegensatz zu gelöst vorliegenden Antigenen – bei, wie auch ihre Dimensionen. Denn Teilchen im Größenspektrum zwischen 20 nm und 3 µm, in welchem sich auch VLPs und Viren mit einer Größe von 22 bis 150 nm finden (Grgacic & Anderson, 2006; Jeong & Seong, 2017), werden besonders effizient von APCs aufgenommen (Bachmann & Jennings, 2010; Scheerlinck & Greenwood, 2006).

Die Prozessierung und anschließende Präsentation der repetitiven Epitope durch APCs, insbesondere durch dendritische Zellen, ermöglicht die unmittelbare Erkennung durch B-Lymphozyten. Dies führt zu einer sehr starken, humoralen Immunantwort (Liu et al., 2013). Bei der Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Moleküle (major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex) wird darüber hinaus die zelluläre Immunantwort angesprochen und eine zytotoxische T-Zell-Reaktion hervorgerufen (Chackerian, 2007).

Somit bewirkt die Verabreichung von VLPs die Aktivierung einer großen Bandbreite angeborener, zellulärer und humoraler Abwehrmechanismen (Deml et al., 2005; Grgacic & Anderson, 2006; Ludwig & Wagner, 2007; Murata et al., 2003; Paliard et al., 2000; Shen et al., 2013). Aufgrund dessen genügt der Einsatz geringerer Impfstoffdosen zum Aufbau der

Immunität. Ein Gesichtspunkt, der besonders in der Tiermedizin, wo der wirtschaftliche Wert des Tieres oft gegen die Kosten der Impfung aufgewogen wird, nicht zu vernachlässigen ist (Crisci et al., 2012). Im selben Zusammenhang ist es von Interesse, dass VLPs keine Nicht-Struktur-Proteine von Viren enthalten. Dies ermöglicht die Anwendung der DIVA-Strategie zur Unterscheidung geimpfter von infizierten Tieren bei Überwachungsprogrammen von Tierseuchen (Crisci et al., 2012; Liu et al., 2013).

2.5.1 Aufbau der durch ILTV-Glykoproteine pseudotypisierten VLPs

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten VLPs setzen sich aus retroviralen Kapsidproteinen des Moloney murinen Leukämievirus zusammen (MMLV), die von einer von der Wirtszelle abgeleiteten Lipidmembran umhüllt sind. Darin eingelagert sind ausgewählte Glykoproteine des ILT-Virus, die somit als Antigene präsentiert werden.

Wie bei allen Retroviren umfasst auch das Genom des Gammaretrovirus MMLV die drei offenen Leseraster *gag*, *pol* und *env*. Diese codieren als sogenanntes gruppenspezifisches Antigen (*gag*) für die Proteine von Kapsid und Matrix; für Enzyme, wie reverse Transkriptase, Protease oder Integrase (*pol*) und für die Oberflächenglykoproteine (*env*) des Retrovirus. Die Bildung von VLPs setzt jedoch nicht die Anwesenheit aller Komponenten voraus. Das hochkonservierte Strukturpolyprotein des Kapsids allein ist bereits dazu fähig, intrazellulär Oligomere zu bilden, die anschließend zum Budding an die Zellmembran der Wirtszelle geleitet werden (Deml et al., 2005). Nach proteolytischer Spaltung des Vorläuferproteins beim Verlassen der Zelle (Hadravova et al., 2011) entstehen 100 bis 120 nm große, behüllte VLPs, die etwa 1500 bis 1800 *gag*-Monomere umfassen (Haffar et al., 1990; Wagner et al., 1992).

Werden die in die Lipidmembran eingelagerten Hüllproteine (*env*) des ursprünglichen Virus durch solche anderer Viren ersetzt, entstehen sogenannte „pseudotypisierte“ Viruspartikel, welche – abhängig von der Funktion der eingelagerten Moleküle – dann beispielsweise den Zelltropismus und/oder die Immunogenität der neuen Hüllkomponenten aufweisen (Sharma et al., 1997).

Den VLPs der hier präsentierten Arbeit liegen folgende Elemente zugrunde:

Sowohl MMLV-*gag* als auch die jeweiligen Glykoproteine liegen plasmidcodiert und durch den CMV-Promotor reguliert vor. Der intrazelluläre Transfer der Glykoproteine und ihr letztllicher Einbau in die Zellmembran wird durch die Fusion des Signalpeptids und der

Transmembrandomäne des Platelet derived growth factor receptor (PDGFR) an das jeweilige Glykoprotein sichergestellt.

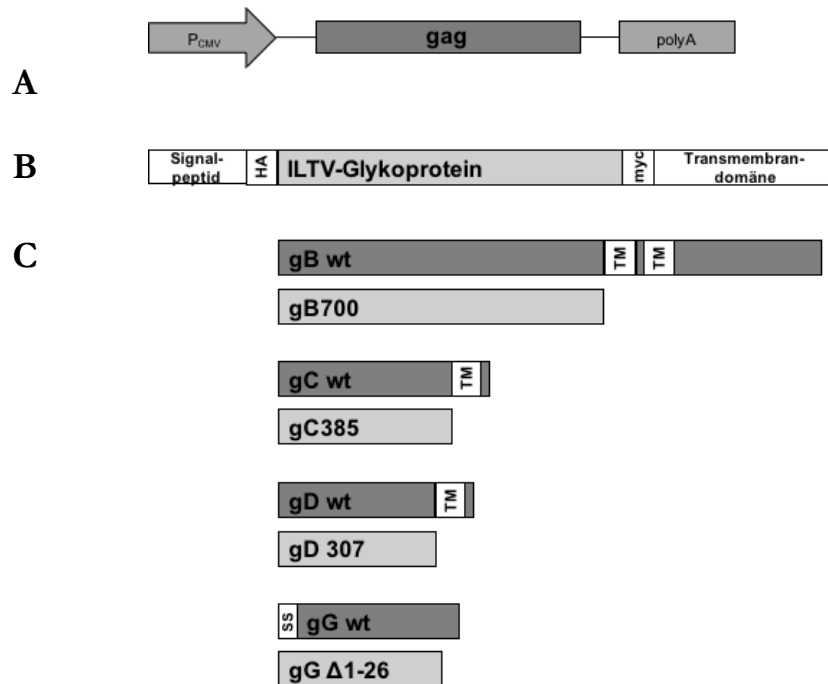


Abb. 2-1 Schema der einzelnen Komponenten zur VLP-Produktion.

A: MLV-*gag*-Expressionsplasmid. **B:** Schema des relevanten Teils des Klonierungsvektors pDisplay mit Insertionsstelle für die ILTV-Glykoproteine, Signalpeptid, PDGFR-Transmembrandomäne, HA- und myc-Tag. **C:** Schema der Wildtyp-Glykoproteine (dunkel) und der abgeleiteten Anteile, welche, in das Expressionsplasmid pDisplay kloniert, zur VLP-Produktion verwendet wurden (hell). Die Zahl nach dem jeweiligen Glykoprotein gibt die Anzahl der exprimierten Aminosäuren an. P_{CMV} = CMV-Promotor, TM = Transmembrandomäne, SS = Sekretionssequenz.

2.6 Adjuvantien

Adjuvantien – abgeleitet vom lateinischen Verb „adiuvare“, „helfen“ – sind Substanzen, die in Kombination mit einem spezifischen Antigen, zu einer stärkeren Immunantwort führen als das Antigen allein.

Die Fähigkeiten von Adjuvantien umfassen eine große Bandbreite von Mechanismen, welche Einfluss auf die Wirkung von Impfstoffen nehmen: Sie sind dazu in der Lage, die Immunogenität von per se schwachen Antigenen zu verstärken. Dadurch ist es möglich, die Menge an benötigtem Antigen zu vermindern, beziehungsweise die Anzahl der Impfungen, die zum Aufbau einer belastbaren Immunantwort vonnöten sind, einzuschränken, was wiederum eine Reduktion der Kosten gestattet. Darüber hinaus bietet die Verwendung von Adjuvantien die Möglichkeit, das Eintreten der Immunantwort zu beschleunigen, ihre Dauer zu verlängern

oder die Art der Antwort zu modulieren. Dies umfasst neben der gezielten Verstärkung spezifischer humoraler oder zellulärer Immunmechanismen auch die Unterstützung der lokalen Abwehrbarrieren an den Schleimhäuten. Schließlich erlauben Adjuvantien, die Interferenz zwischen maternalen und Impfantikörpern oder auch zwischen den verschiedenen Antigenen multivalenter Impfstoffe zu umgehen und führen auf diese Weise zur Etablierung einer verstärkten, anhaltenden, spezifischen und belastbaren Immunität (García & de Sanctis, 2013; Singh & O'Hagan, 2003; Spickler & Roth, 2003).

Ogleich die genaue Funktionsweise der meisten Adjuvantien nicht detailliert bekannt ist, lässt sich deren Wirkungsmechanismus grundlegend in zwei Kategorien einteilen: Einerseits fungieren sie als Vehikel zur Präsentation des gewünschten Antigens und andererseits bewirken sie die Modulation der Immunantwort (Dey & Srivastava, 2011).

Der erstgenannte Mechanismus setzt die Bindung des Antigens an das Adjuvans voraus, wodurch es eine partikuläre Struktur annimmt. Partikuläre Substanzen werden, anders als lösliche Moleküle, prinzipiell besser vom Immunsystem erkannt und phagozytiert (Cox & Coulter, 1997; Dey & Srivastava, 2011). Eingebettet in den Komplex wird das Vakzin im Körper zurückgehalten, wodurch das Antigen in ausreichend hoher Konzentration und genügend langer Dauer den Komponenten des Immunsystems gegenüber exponiert ist und damit eine Depotwirkung entfalten kann (Bowersock & Martin, 1999). Darüber hinaus können partikuläre Vakzine an spezielle Oberflächenstrukturen im Gewebe binden und somit das Antigen zu einem bestimmten Zielgewebe schleusen oder an der Injektionsstelle zurückhalten (García & de Sanctis, 2013; Spickler & Roth, 2003).

Der zweite, grundlegende Mechanismus, die Immunmodulation, wird durch den Einsatz von Substanzen erreicht, welche selbst das Immunsystem stimulieren und durch eine folglich veränderte Zytokin- und Chemokinausschüttung die Qualität der Immunantwort abwandeln (Bowersock & Martin, 1999).

Diese weitreichende Einflussnahme auf das Immunsystem hat ihren Preis: Manche Adjuvantien verstärken die Nebenwirkungen der eigentlichen Impfschubstanz oder führen zu Nebeneffekten gemäß ihren chemischen Eigenschaften. Die häufigsten Nebenwirkungen umfassen lokale Entzündungsreaktionen, sowie die Bildung von Granulomen oder sterilen Abszessen (Spickler & Roth, 2003).

Derartige Nebenwirkungen sind auch in der Tiermedizin verheerend. Denn neben dem Unbehagen und den Schmerzen, die dies den Tieren zufügt, sind im Nutztiersektor auch die dadurch bedingten Einbußen der Fleischqualität und der Rückgang der Produktivität und der

folglich auftretende, wirtschaftliche Schaden nicht zu vernachlässigen (Asif et al., 2004).

Die zwei in der Veterinärmedizin am häufigsten verwendeten Adjuvantien sind Aluminiumsalze und Ölemulsionen.

Eine Variante, welche die Überwindung der beschriebenen, schädlichen Nebenwirkungen und auch des Problems von Rückständen im Organismus verspricht, stellen Zytokine dar, welche als sogenannte „natürliche Adjuvantien“ bezeichnet werden (Lowenthal et al., 1998; Lowenthal et al., 1999).

2.6.1 Aviäre Zytokine als Adjuvantien

Ein Großteil der heute eingesetzten Adjuvantien bewirkt im geimpften Organismus die Ausschüttung verschiedener Zytokine, die wiederum zu einer Verstärkung der Immunantwort beitragen. Somit können auch spezifische Zytokine direkt als Adjuvantien eingesetzt werden.

Zytokine sind kleine, lösliche Proteine oder Glykoproteine, die von vielen Zelltypen produziert und als Mediatoren sezerniert werden. Als solche entfalten sie auf autokrine, parakrine oder bisweilen endokrine Weise (Arai et al., 1990) ihre verstärkende oder hemmende Wirkung auf die Proliferation, Differenzierung oder Aktivierung von Zellen und nehmen so eine Schlüsselrolle im Immun- und Entzündungsgeschehen und der Homöostase ein (Asif et al., 2004; Giansanti et al., 2006; Rahman & Eo, 2012; Wigley & Kaiser, 2003).

Zytokine werden entweder konstitutiv sezerniert oder erst als Reaktion auf einen Stimulus hin produziert oder freigesetzt, wie beispielsweise durch die Anwesenheit infektiöser Agentien, Entzündungsmediatoren oder anderer Zytokine. Daraufhin binden sie mit hoher Affinität an ligandenspezifische Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen, wo sie den Anstoß für intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden geben (Stanley & Lacy, 2010; Stow & Murray, 2013).

Aufgrund dieser spezifischen Bindung ist die Wirkung von Zytokinen sehr potent, was die Verabreichung in äußerst geringen Dosen erlaubt.

In Abhängigkeit von der Kombination von Zytokinen, die ausgeschüttet wird, ergibt sich eine spezifische Antwort im Körper, da die Freisetzung eines einzelnen solchen Botenstoffes immer die Ausschüttung weiterer nach sich zieht und deren Wirkung sich jeweils antagonistisch, synergistisch oder additiv entfaltet.

Zytokine bestimmen auf diese Weise über die Qualität und die Quantität der jeweils dominierenden Immunantwort infolge einer Infektion oder einer Impfung (Kogut, 2000; Rahman & Eo, 2012).

Neben ihrem Einsatz als Adjuvantien in Impfstoffen, ist die Verwendung von Zytokinen beim Vogel als Therapeutikum zur unspezifischen Anregung des Immunsystems beschrieben und ebenso deren Verabreichung während der ersten Lebenswoche zur beschleunigten Reifung des Immunsystems. In dieser Phase ist die Anfälligkeit für Infektionskrankheiten besonders hoch, da das Ineinandergreifen von angeborener und erworbener Immunantwort im aviären Organismus noch nicht gewährleistet ist (Kogut, 2000).

Die Zytokine des Huhns sind generell auf einer geringeren Anzahl von Genen codiert als ihre Entsprechungen im Säugetier und teilen mit ihnen auch nur zwischen 30 und 50 % Sequenzhomologie (Hilton et al., 2002; Kaiser, 2010; Kaiser et al., 2005).

Die namensgebende Einteilung in Interferone, Interleukine (IL), Transforming growth factors (TGF, Verändernde Wachstumsfaktoren), Tumornekrosefaktoren (TNF), Colony stimulating factors (CSF, Kolonie stimulierende Faktoren) und Chemokine stützt sich auf verschiedene strukturelle oder funktionelle Gesichtspunkte (Kaiser, 2010).

Beim Säuger werden umgekehrt naive $CD4^{+}$ -T-Helfer-Lymphozyten entsprechend ihres Zytokinprofiles eingeteilt und umfassen Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 und folliculäre T-Effektorzellen (Akdis et al., 2011).

Da jedoch die Übertragbarkeit dieser Einteilung auf das aviäre Immunsystem bislang noch nicht bestätigt ist (Kaiser, 2010), werden aviäre Zytokine wie folgt klassifiziert:

Proinflammatorische Zytokine vermitteln Entzündungsreaktionen bei Krankheit oder Verletzungen. Th1-Zytokine sind Botenstoffe der zellvermittelten Immunantwort und dienen der Aktivierung von Makrophagen, wohingegen Th2-Zytokine die humorale Immunität fördern und die Produktion von Antikörpern stützen. Th3- oder T_{reg} -Zytokine schließlich leisten einen Anteil an regulatorischen Prozessen und sind möglicherweise auch in den Aufbau der mukosalen Immunantwort involviert (Wigley & Kaiser, 2003).

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit zum Einsatz als Adjuvantien untersuchten Interleukine ChIL-2 und ChIL-18 näher beschrieben.

2.6.2 Interleukin 2 des Huhnes (Chicken Interleukin 2, ChIL-2)

Durch die getrennte Phylogenese des erworbenen Immunsystems der verschiedenen Wirbeltierklassen bestehen auf genetischer Ebene erhebliche Unterschiede zwischen dessen Komponenten bei Säugern und Vögeln (Kaiser et al., 2005). Daher wurde ChIL-2 erst im Jahr 1997, ausgehend von einer cDNA-Bibliothek aktivierter Hühnermilzzellen identifiziert (Sundick & Gill-Dixon, 1997). Die Aminosäuresequenz erbrachte sowohl eine schwache Übereinstimmung mit der des bovinen Interleukins 2 (IL-2) als auch mit der des bovinen Interleukins 15. Die Analyse der Promotorsequenz, der Introns und Exons und der Lokalisation auf Chromosom 4 bestätigte anschließend seine Analogie zu IL-2 der Säuger (Kaiser & Mariani, 1999). Auch die Übereinstimmung mit IL-2 der Pute liegt mit weniger als 70 % recht niedrig (Lawson et al., 2000).

IL-2 führt zur Aktivierung und Proliferation von T-Zellen. Daher zählt es zu den Th1-Zytokinen (Rahman & Eo, 2012) und führt den Beinamen „T-Zell-Wachstumsfaktor“ (Wigley & Kaiser, 2003). Seine Produktion ist transient und erfolgt hauptsächlich durch $CD4^{+}$ - und $CD8^{+}$ -T-Lymphozyten nach deren Aktivierung und in geringerem Maße durch aktivierte, dendritische Zellen (DC, dendritic cells), natürliche Killerzellen (NK) und NK-T-Zellen. Die Zielzellen von IL-2 umfassen ebenfalls $CD4^{+}$ - und $CD8^{+}$ -T-Lymphozyten, sowie NK- und B-Zellen (Akdis et al., 2011). Darüber hinaus wirkt ChIL-2, abhängig vom Alter des Huhns, aktivierend auf die Phagozytose und die bakterizide Wirkung von Heterophilen *in vitro* (Kogut et al., 2003; Kogut et al., 2002).

Durch Abspaltung einer Signalsequenz für den intrazellulären Transport und Glykosylierung entsteht das reife, 121 Aminosäuren umfassende ChIL-2, das per Exozytose sezerniert wird (Stanley & Lacy, 2010; Sundick & Gill-Dixon, 1997). Allerdings ist der Glykosylierungsschritt nicht notwendig, um biologisch aktives, rekombinantes ChIL-2 herzustellen (Stepaniak et al., 1999).

Der IL-2-Rezeptor (IL-2R) auf der Oberfläche der Zielzellen setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen. Beim Säuger sind dies die ligandenspezifische α -Kette (IL-2R α), welche in Kooperation mit der β -Kette (IL-2R β) die Bindung des Zytokins ermöglicht. Dagegen ist das Zusammenwirken der β - und der γ -Untereinheit (γ c, γ -Chain) zur Signaltransduktion notwendig.

Während das Dimer aus IL-2R β und γ c in geringer Zahl auf ruhenden T-Zellen exprimiert wird,

führt erst die Bindung von IL-2 zur Induktion von IL-2R α auf der Zelloberfläche, wodurch der für IL-2 hochaffine Rezeptorkomplex entsteht und sich die Konzentration von IL-2, die zur Stimulation benötigt wird, drastisch erniedrigt.

Nur regulatorische T-Zellen (T_{reg}, CD4⁺CD25⁺) und CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, welche durch ein Antigen aktiviert wurden, exprimieren alle drei Komponenten, die den hochaffinen IL-Rezeptor bilden, auf ihrer Zellmembran und stellen daher auch die vorherrschenden Zielzellen für IL-2 dar (Akdis et al., 2011; Gu et al., 2010; Teng et al., 2006). Ungebundenes ChIL-2 persistiert nur für wenige Minuten im Organismus; ein Charakteristikum vieler Zytokine. Die Bindung an seinen Rezeptor jedoch führt durch Differenzierung und Proliferation zum Anstieg der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen im peripheren Blut (Hilton et al., 2002).

Neben seiner herausragenden Rolle bei der Aktivierung einer T-Zell abhängigen Immunantwort, wirkt IL-2 in höheren Konzentrationen auch stimulierend auf B-Zellen und fördert deren Antikörperproduktion, sowie auf die zytolytischen Fähigkeiten von NK-Zellen und Makrophagen.

Beim Säuger werden dem entgegen CD4⁺-T-Lymphozyten durch wiederholte Aktivierung mit IL-2 zunehmend sensitiv für Apoptose. Dies ist ein Kontrollmechanismus des Körpers, um eine persistierende Immunantwort zu unterbinden. Dieselbe Funktion erfüllen T_{reg}-Zellen, für deren Entwicklung ebenfalls IL-2 das entscheidende Zytokin darstellt (Bachmann & Oxenius, 2007; Fehervari et al., 2006; Gaffen & Liu, 2004; Malek & Bayer, 2004). Aufgrund dieser Eigenschaft ist ein potentiell Einsatzgebiet von IL-2 im Säugerorganismus die Behandlung von Autoimmunerkrankungen und die Vorbeugung von Transplantatabstoßungen (Akdis et al., 2011).

Anders im Huhn, wo auch hohe Dosen von ChIL-2 keinen hemmenden Einfluss auf dessen T-Zell-proliferative Eigenschaften erbrachten (Hilton et al., 2002).

Als Substanz mit der Fähigkeit, die aviäre Immunantwort in vieler Weise anzuregen, wurde die Verwendung von ChIL-2 als Adjuvans für Geflügelimpfstoffe experimentell ausgelotet. Dafür wurde plasmidcodiertes ChIL-2 eingesetzt oder die Verabreichung mittels Vektorimpfstoff angewandt.

Während die Gabe von IBDV-DNA-Vakzin in Kombination mit ChIL-2-Plasmid in zwei Studien zu erhöhten Antikörpertitern führte (Hulse & Romero, 2004; Li et al., 2004) und in einer weiteren zur Verminderung histologischer Befunde (Kumar et al., 2009), konnte nach *in-ovo*-Administration eines Impfstoffes aus IBDV-DNA und ChIL-2-DNA und einer zusätzlichen Applikation von Totimpfstoff nach Schlupf keine Verstärkung der Immunantwort

durch ChIL-2 beobachtet werden (Park, 2009). Bei *in-ovo*-Impfung mit IBDV- und IBV-Lebendvakzin führte die gleichzeitige Verabreichung eines rekombinanten, ChIL-2 exprimierenden Herpesvirus zu erhöhten Antikörpertitern und signifikant verbessertem Schutz (Tarpey et al., 2007), wohingegen die Verabreichung eines ChIL-2 exprimierenden HVT-Vektors zwar den Antikörpertiter erhöhen, jedoch keinen Einfluss auf den Schutz vor Infektion mit der Marekschen Krankheit bieten konnte (Tarpey et al., 2007). Im Gegensatz dazu induzierte ein bicistronisches Plasmid mit der Information für ein Antigen von IBV und für ChIL-2 eine verstärkte zelluläre Immunantwort (Tang et al., 2008). Schließlich konnte ein ChIL-2 exprimierender, rekombinanter NDV-Stamm die krankheitsbedingten Läsionen abmildern und den viralen Titer erniedrigen, führte allerdings zu unverändert schweren klinischen Symptomen (Susta et al., 2015). ChIL-2 wurde nicht nur als Adjuvans bei der Bekämpfung viraler Infektionen getestet sondern auch bei Studien mit transgenen Eimerien eingesetzt, bei denen ebenfalls eine Verstärkung der zellulären Immunantwort beschrieben wurde (Zhuoran et al., 2015).

Diese Vielfalt biologischer Effekte spiegelt den pleiotropen Charakter von ChIL-2 wieder, der im Organismus darüber hinaus noch durch das Zusammenspiel verschiedener Zytokine verstärkt wird (Hilton et al., 2002; Kogut, 2000).

2.6.3 Interleukin 18 des Huhnes (Chicken Interleukin 18, ChIL-18)

Ursprünglich wurde IL-18 als Interferon- γ (INF- γ) induzierender Faktor bezeichnet, da seine vorherrschende Funktion die Anregung der INF- γ -Produktion durch Th1-, NK- und NK-T-Zellen ist. Daneben übt IL-18 weiteren Einfluss auf T-, B- und NK-Zellen aus, der in der Produktion einer Vielzahl anderer Zytokine resultiert (Hilton et al., 2002).

IL-18 wird als proinflammatorisches Th1-Zytokin klassifiziert (Guo et al., 2013; Wigley & Kaiser, 2003).

ChIL-18 gehört der IL-1-Familie an. In Säugern umfasst diese Gruppe elf Zytokine und ihre zugehörigen Rezeptoren. Ihre Zusammengehörigkeit ergibt sich aus der Hypothese, dass ihre Gene sich durch Verdopplung, ausgehend von einem gemeinsamen Ursprungsgen entwickelten, was sich in vielen, gemeinsamen Eigenschaften widerspiegelt. Im Huhn konnten mit IL-1 β , IL-1RN, IL-36RN und IL-18 bislang nur vier Orthologe der IL-1-Familie kloniert werden (Gibson et al., 2014).

Wie ChIL-1 β verfügt ChIL-18 über keine spezifische Signalsequenz zum intrazellulären

Transport und wird zunächst als inaktives Propeptid mit einer Länge von 198 Aminosäuren exprimiert. Nach Spaltung durch Caspase-1 (IL-1 Converting Enzyme) erlangt es seine biologisch aktive Form von 169 Aminosäuren und kann sezerniert werden. Die Synthese von ChIL-18-mRNA und seines Vorläuferproteins erfolgt konstitutiv. Die Regulation seiner Aktivität erfolgt intrazellulär auf der Ebene der Prozessierung des Propeptids und seiner Sekretion (Puren et al., 1999; Stanley & Lacy, 2010).

Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von ChIL-18 mit seinem Analogon im Säuger beläuft sich auf nur rund 30 % (Schneider et al., 2000), wohingegen es zum IL-18 der Pute mit 96,4 % einen bemerkenswert hohen Grad an Übereinstimmung aufweist (Kaiser et al., 2005).

Der IL-18 Rezeptor ist in großer Anzahl auf der Oberfläche vieler Zelltypen zu finden, darunter T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, Epithelzellen und Chondrozyten (Akdis et al., 2011).

IL-18 wird von einem breiten Spektrum von Zellen produziert. Hierzu zählen Dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen, Kupffer-Zellen, Osteoblasten, Keratinozyten, Astrozyten, sowie T- und B-Lymphozyten (Akdis et al., 2011; Giansanti et al., 2006).

Im Beisein von IL-12 entfaltet sich die synergistische Wirkung der beiden Interleukine IL-12 und IL-18, was zur Produktion von INF- γ führt, da IL-12 die Expression des IL-18-Rezeptors auf zuvor unbeteiligten T- und NK-Zellen anregt. Dadurch werden diese Zellen für IL-18 zugänglich (Ahn et al., 1997). Das Zusammenspiel der beiden Interleukine führt schließlich zur Aktivierung des INF- γ -Promotors (Barbulescu et al., 1998). Die Ausschüttung von INF- γ vermittelt zwischen angeborenen und erworbenen Immunmechanismen. Es erfüllt eine wichtige Funktion bei der Induktion der Th1 gerichteten Immunantworten und stellt somit einen Baustein bei der Bekämpfung von Viren dar (Rahman & Eo, 2012). Umgekehrt bewirkt IL-18 die verstärkte Expression des IL-12-Rezeptors, wodurch die IL-12 vermittelte Entwicklung von Th1-Zellen unterstützt wird.

Neben der Produktion von INF- γ ist die vorherrschende Aufgabe von IL-18 die Unterstützung der zellulären Immunantwort durch Aktivierung von Th-Zellen. Anders als in Säugern, wo IL-18 direkt die zytotoxische Wirkung von NK- und CD8⁺-T-Zellen fördert, bewirkt ChIL-18 im Huhn vorrangig die Proliferation CD4⁺-T-Lymphozyten und ist das Hauptelement für deren INF- γ -Produktion. ChIL-18 ist ohne weitere unterstützende Signale dazu in der Lage, die Proliferation und Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen zu bewirken, im Gegensatz zum entsprechenden Protein im Säugetier, wo dies, so wie die Produktion von INF- γ , vom Mitwirken weiterer Substanzen abhängt (Göbel et al., 2003).

Allerdings ist der IL-18-Effekt abhängig vom umgebenden Zytokinmilieu und somit kann eine Immunantwort entweder zugunsten einer Th1- oder einer Th2-Antwort ausfallen (Nakanishi et al., 2001; Pollock et al., 2003).

Darüber hinaus induziert IL-18 die Bildung von IL-1 β , von TNF- α und von weiteren Chemokinen (Schneider et al., 2000). Die proinflammatorische Wirkung von IL-18 wurde belegt durch erhöhte Spiegel von IL-18-mRNA nach Infektion mit dem Galliden Herpesvirus 2 (MDV) oder mit LPS (Lipopolysaccharid) von *Salmonella* Typhimurium *in vivo* und in Heterophilen nach Corticosteron-Gabe (Gibson et al., 2014).

Die Wirkung von ChIL-18 als Adjuvans in Impfstoffen wurde durch seine Verabreichung mittels Expressionsvektor oder plasmidcodiert gegen Infektiöse Bursitis, ILT, die Newcastle-Krankheit, Infektiöse Bronchitis und Kokzidiose getestet (Chen et al., 2011; Chen et al., 2011; Chen, Yang, et al., 2010; Chen, Zhao, et al., 2010; Hung et al., 2010; Shi et al., 2014; Wang et al., 2015), was jeweils zu verbessertem Schutz vor Krankheitssymptomen führte und sowohl erhöhte Antikörpertiter als auch ein verändertes Verhältnis zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten erbrachte.

2.7 *In-ovo*-Vakzination

Bedingt durch hohe Tierzahlen in kommerziellen Geflügelbeständen erfolgt die Verabreichung von Impfstoffen in diesem Feld vorzugsweise oral über das Trinkwasser oder aerogen durch Vernebelung des Impfstoffes, was die gleichzeitige Impfung vieler Individuen erlaubt. Dazu geeignet sind jedoch nur attenuierte Lebendimpfstoffe. Zur Gabe von Impfstoffen, die auf inaktivierten Impfstämmen oder anderen, nicht replikationsfähigen Systemen beruhen, und bei Impfungen von Kleinbeständen oder Hobbyhaltungen kommt meist die Einzeltiervakzination zum Einsatz. Die Applikation erfolgt hierbei durch Konjunktival- und Nasenlochtropfmethode oder durch Injektion. Diese Anwendungen gewährleisten - im Gegensatz zu den eingangs beschriebenen Massenapplikationsmethoden - die Aufnahme einer ausreichenden Dosis des Impfstoffs durch jedes einzelne Tier. Sie sind jedoch mit hohem Arbeitsaufwand und erheblichem Stress für die Tiere verbunden.

Ein weiteres, relativ neues Konzept der Impfstoffapplikation ist die *in-ovo*-Vakzination - eine Möglichkeit, Vögel bereits vor dem Schlupfzeitpunkt zu immunisieren - sodass die Gefahr einer Infektion unmittelbar nach dem Schlupf vermieden wird. Erstmals wurde die neue Technik von Sharma & Burmester (1982) beschrieben, die Küken im Embryonalstadium mit einem

Putenherpesvirus gegen die Mareksche Krankheit impften und deren anschließenden Schutz bei einer experimentellen Infektion am dritten Tag nach dem Schlüpfen feststellten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die *in-ovo*-Impfung keinen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Embryonen und die Schlupfrate hat, wie auch, dass ein früherer Schutz vor Infektionen erwirkt werden kann als durch die herkömmlichen Impfmethode nach dem Schlupf (Sharma, 1986; Sharma & Witter, 1983). Ebenso werden Produktionsparameter wie Jungtiersterblichkeit, Futterverwertung und Gewichtszunahme durch die Impfung im Embryonalstadium nicht negativ beeinflusst (Gildersleeve et al., 1993; Sarma et al., 1995).

Allerdings bestimmen der Impfzeitpunkt und die Lokalisation des Impfstoffs im Brutei maßgeblich über den Erfolg der *in-ovo*-Vakzination (Ricks et al., 1999; Wakenell et al., 2002): Da die Entwicklung des aviären Immunsystems bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Embryogenese einsetzt (Seto, 1981; Sharma & Tizard, 1984), erlaubt die Impfung an Bebrütungstag 18 den Aufbau einer schützenden Immunantwort, ohne jedoch zur Immuntoleranz gegenüber dem Infektionserreger oder zur Beeinträchtigung der Immunkompetenz der Küken zu führen (Negash et al., 2004; Sharma & Burmester, 1982). Darüber hinaus ist die gezielte Applikation des Wirkstoffes in die Amnionhöhle am 18. Bebrütungstag technisch gut durchführbar (Gildersleeve et al., 1993; Jochemsen & Jeurissen, 2002; Sharma & Burmester, 1982). Von dort ausgehend, wird der Impfstoff vom Embryo oral aufgenommen (Gildersleeve et al., 1993; Islam et al., 2001; Sharma & Burmester, 1982) und in die Atemwege (Sharma & Burmester, 1984) und den Verdauungstrakt weitertransportiert (Jochemsen & Jeurissen, 2002). Impfungen zu einem früheren Zeitpunkt sind weniger effektiv, da die injizierten Substanzen vermehrt in die Allantoishöhle gelangen, was für die Aufnahme durch den Embryo ebenso ungeeignet ist wie eine Applikation in die Luftkammer des Bruteis (Jochemsen & Jeurissen, 2002; Wakenell et al., 2002). Auch in technischer Hinsicht eignet sich Embryonaltag 18 zur Impfung, da an diesem Tag ohnehin der Transfer der Bruteier in den Schlupfbrüter stattfindet.

Neben der Verwendung von attenuierten Lebendimpfstoffen zur Immunisierung im Ei wurden experimentell DNA-Vakzine - und damit nicht replikationsfähige Substanzen - zur *in-ovo*-Vakzination eingesetzt (Ding et al., 2005; Haygreen et al., 2006; Kapczynski et al., 2003; Oshop et al., 2003; Park et al., 2009). Allerdings erwies sich der durch eine einzelne Applikation *in ovo* induzierte Immunschutz als nicht belastbar, sodass nach einer DNA-Applikation *in ovo* eine weitere Impfung nach Schlupf unumgänglich scheint.

Durch Einführung eines automatisierten Verfahrens zur *in-ovo*-Vakzination im Jahre 1992 (Ricks et al., 1999) konnte eine Impfrate von inzwischen 50 000 Eiern pro Stunde (Williams &

Zedek, 2010) etabliert werden. Mittlerweile gilt die *in-ovo*-Vakzination als Standardmethode zur Impfung gegen die Mareksche Krankheit in den USA (Gagic et al., 1999; Haygreen et al., 2006) und wird routinemäßig in Brütereien in Japan, Australien, Amerika und auch in Teilen Europas angewendet (Williams & Hopkins, 2010).

Somit bietet die *in-ovo*-Vakzination eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber der Impfung nach Schlupf:

Jedes Ei erhält eine einheitliche und exakte Impfstoffdosis. Dadurch und dank des früheren Impfzeitpunkts verfügt das Tier bereits beim Schlupf über einen zuverlässigen Schutz vor dem Infektionserreger. Es kann sowohl die Belastung der Tiere vermindert als auch der Aufwand an Arbeitszeit und -kosten gesenkt werden.

2.8 Phänotypisierung der Lymphozyten des peripheren Blutes von Hühnern mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Phänotypisierung von Zellen. Diese können aufgrund ihrer Grösse und Granularität unterschieden werden. Darüber hinaus können zelltypspezifische Oberflächenproteine durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper markiert werden, was eine sehr präzise Unterscheidung der Zellen ermöglicht. Somit können Untergruppen von Immunzellen bzw. deren Verhältnis zueinander bestimmt werden. Die durch eine Infektion provozierten Abwehrreaktionen führen zu einer Aktivierung unterschiedlicher Zellen (Collisson et al., 2000; Hunt et al., 2001; Juul-Madsen et al., 2002; Loa et al., 2001). Dabei ist die Veränderung von deren Verhältnis zueinander und nicht zwingend ihre absolute Anzahl ein entscheidendes Kriterium zur Messung der Immunantwort (Parmentier et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass das Verhältnis bestimmter Subpopulationen von Immunzellen mit der Empfänglichkeit und der Resistenz gegen Krankheiten korreliert (Cheng et al., 2001; Ewald et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden CD3, CD4 und CD8 als Marker verwendet. CD3 bildet die Signalkomponente des T-Zellrezeptors (TCR, T-cell receptor) zur Aktivierung von T-Lymphozyten und diente im Versuchsaufbau der Selektion der T-Lymphozyten.

CD4 ist als Korezeptor auf T-Helferzellen, T_{reg}-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen lokalisiert (Fair et al., 2008). Bei CD8 handelt es sich um ein Oberflächenglykoprotein, das als Co-Rezeptor des MHC-Klasse-I-Moleküls Anteil an der Antigenerkennung hat. CD8 wird auf zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen exprimiert (Chan

et al., 1988; Martin & Resch, 2009).

CD4⁺-T-Lymphozyten induzieren und unterstützen die Immunantwort durch die Sekretion von Zytokinen, sie regen die Proliferation, Reifung und Aktivierung von CD8⁺-T-Lymphozyten an und wirken außerdem fördernd auf B-Zellen. CD8⁺-T-Lymphozyten sind Effektorzellen der zellulären Immunantwort und durch ihre zytotoxische Aktivität entscheidend für die Eindämmung von Infektionen. Das Verhältnis zwischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten dient als Indikator für die generelle Funktion des Immunsystems (Chen et al., 2011).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Reagenzien

Tabelle 3-1 Chemische Reagenzien und ihre Herkunft.

| Substanz | Bezugsquelle |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 Kb Plus DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| 100 bp DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| 2-Mercaptoethanol (55 mM) | Roth AG, Arlesheim CH www.carlroth.com / www.carlroth.ch |
| Aceton | Merck KGaA, Darmstadt www.merck.com |
| Acrylamid-Bis Fertiglösung, 30% | Merck KGaA, Darmstadt www.merck.com |
| Agarose, LE, Analytical Grade | Promega AG, Dübendorf CH www.promega.com |
| Albumin Fraktion V | Roth AG, Arlesheim CH www.carlroth.com / www.carlroth.ch |
| Ammoniumpersulfat (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Ampicillin (100 µg/ml Ampicillin) | Becton Dickinson AG, Allschwil CH www.bdbiosciences.com |
| Aqua bidest. (ddH ₂ O) | Zubereitet am Institut für Veterinär bakteriologie, Universität Zürich, Schweiz |
| BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| Bovines Serumalbumin (BSA, 2 mg/ml) | Bio-Rad Laboratories AG, Cressier FR www.bio-rad.com |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Amresco LLC, Solon www.amresco-inc.com |
| Bromphenolblau (Natriumsalz) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$) | Roth AG, Arlesheim CH www.carlroth.com / www.carlroth.ch |
| Carbonat-Bicarbonat-Puffer | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| dNTPs (10mM) | QIAGEN AG, Hombrechtikon CH www.qiagen.com |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Donkey Serum | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| ETA C Ultra 2.0 Westar | Cyanagen, Bologna www.cyanagen.com |
| Ethanol absolute | Merck KGaA, Darmstadt www.merck.com |
| Ethidiumbromid Lösung (EtBr), 1% | Roth AG, Arlesheim CH www.carlroth.com |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Merck KGaA, Darmstadt www.merck.com |
| FACS Lysing Solution | Becton Dickinson AG, Allschwil CH www.bdbiosciences.com |
| Fetales Bovines Serum (FBS), 10% | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| Ficoll 400 | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Gel Loading buffer II | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Goat serum | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| Histopaque® - 1077 | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Ionomycin aus Streptomyces conglobatus, 98 % (HPLC) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Kaliumchlorid (KCl) | Roth AG, Arlesheim CH www.carlroth.com / www.carlroth.ch |
| Kolloidales Gold, Total Protein Stain | Bio-Rad Laboratories AG, Cressier FR www.bio-rad.com |
| LB Agar | Becton Dickinson AG, Allschwil CH www.bdbiosciences.com |
| LB Bouillon | Becton Dickinson AG, Allschwil CH www.bdbiosciences.com |
| Mangan(II)chlorid Tetrahydrat (MnCl ₂ x 4 H ₂ O) | Roth AG, Arlesheim CH www.carlroth.com / www.carlroth.ch |
| Methanol, 99 % | Merck KGaA, Darmstadt www.merck.com |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Merck KGaA, Darmstadt www.merck.com |
| Natriumchlorid (NaCl puriss. p.a.) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Novex® AP Chromogenic Substrate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/p-nitro blue tetrazolium chloride substrate) | Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Novex® HRP Chromogenic Substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) | Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| Opti-MEM® | Gibco, Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| Paraformaldehyd | Roth AG, Arlesheim CH www.carlroth.com / www.carlroth.ch |
| Penicillin-Streptomycin 10 000 U/ml | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES) (0,5 M, pH 6,7) | Roth AG, Arlesheim CH www.carlroth.com / www.carlroth.ch |
| Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, 1 mM) | Merck KGaA, Darmstadt www.merck.com |
| Prestained Protein Ladder V | Geneaid Biotech Ltd, Taipei http://www.geneaid.com |
| Protein Assay Dye Reagent Concentrate Coomassie® Brilliant Blue G-250-Lösung | Bio-Rad Laboratories AG, Cressier FR www.bio-rad.com |
| Rapilait, Magermilchpulver | Migros, LeShop www.leshop.ch |
| RNase-free water | QIAGEN AG, Hombrechtikon CH www.qiagen.com |
| RPMI Media 1640 | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| S.O.C. Medium | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| Sucrose | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| TMB-Reagenz (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| <i>TransIT</i> ®-2020 | Mirus Bio LLC, Madison https://www.mirusbio.com |
| Tri-Natrium-Citrat | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht www.sarstedt.com |
| Trichloressigsäure, 100 % (w/v) | Roth AG, Arlesheim CH www.carlroth.com / www.carlroth.ch |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Trypan blue solution (0,4%) | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Trypsin-EDTA-Lösung | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Tween-20 | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Tween-80 | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |

| | |
|---------------------|-------------------------------------------------------|
| Uranylacetat (98 %) | Polysciences Inc., Warrington www.polysciences.com |
| Waymouth's medium | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |

3.2 Enzyme und Puffer

Tabelle 3-2 Enzyme und Puffer und ihre Herkunft.

| Enzym | Puffer | Bezugsquelle |
|----------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Restriktionsendonukleasen | | |
| AflII | NEBuffer 2 + BSA (10x) | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| EcoR V | NEBuffer 3.1 | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| EcoRI | EcoRI Buffer | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| EcoRI-HF | NEB CutSmart | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| HindIII | NEBuffer 2 + BSA (10x) | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| NdeI | Buffer O | Thermo Fisher Scientific - France, Illkirch FR www.thermofisher.com |
| NotI | NEBuffer 3.1 | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| ScaI-HF | NEB CutSmart | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| SpeI | NEB CutSmart | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| SspI | SspI Buffer | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| XhoI | NEB CutSmart/ NEBuffer 4 + BSA (10x) | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| RNase | | |
| RNase H | 10x RNase H Buffer | Thermo Fisher Scientific - France, Illkirch FR www.thermofisher.com |

| DNA-Polymerasen | | |
|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| HotStarTaq DNA Polymerase | 5x Quantiscript RT Buffer | QIAGEN AG, Hombrechtikon CH www.qiagen.com |
| Phusion HighFidelity DNA Polymerase | 5x Phusion HF Buffer | Thermo Fisher Scientific - France, Illkirch FR www.thermofisher.com |
| Taq Polymerase | 1x Taq PCR Buffer | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| weitere Enzyme | | |
| Calf Intestinal Phosphatase (CIP) | NEB CutSmart | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |
| Quantiscript Reverse Transcriptase | 5x Quantiscript RT Buffer | QIAGEN AG, Hombrechtikon CH www.qiagen.com |
| Streptavidin alkalische Phosphatase | ELISpot | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| Streptavidin-HRP | ELISpot | Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| T4 DNA Ligase | Ligasepuffer | New England Biolabs / Bioconcept, Allschwil CH www.neb.com / www.bioconcept.ch |

3.3 Plasmide und DNA

Tabelle 3-3 Plasmide und DNA und ihre Herkunft, mit Eigenschaften und Aufbau.

| Plasmid, DNA | Eigenschaften, Aufbau | Bezugsquelle |
|---------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ILTV-DNA | Isolat des virulenten A-489 ILTV Stamms | Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Deutschland |
| pcDNA3.1-HA-ChIL-2 | Promotor: CMV-IE Resistenzgen: Ampicillin | diese Arbeit |
| pcDNA3_3 TOPO | Promotor: CMV-IE Resistenzgene: Neomycin, Ampicillin | Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| pcDNA-ChIL-2 | Expressionsplasmid für das Hühner-Interleukin 2 | diese Arbeit |
| pcDNA-ChIL-18 | Expressionsplasmid für das Hühner-Interleukin 18 | diese Arbeit |
| pCAGGS | Promotor: Hühner- β -actin Resistenzgen: Ampicillin | Niwa et al., 1991 |

| | | |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| pCAGGS-ChIL-2 | Expressionsplasmid für das Hühner-Interleukin 2 | diese Arbeit |
| pCAGGS-ChIL-18 | Expressionsplasmid für das Hühner-Interleukin 18 | diese Arbeit |
| cDNA aus Hühnersplenozyten | | Amsbio, Abingdon http://www.amsbio.com |
| pLgag | Expressionsplasmid pDisplay, Promotor: CMV Resistenzgen: Ampicillin für VLP-Rückgrat | Zbinden, 2015 |
| pDgB700 | Expressionsplasmid pDisplay, Promotor: CMV Resistenzgen: Ampicillin für ILTV- gB und VLP-Rückgrat | Zbinden, 2015 |
| pDgC385 | Expressionsplasmid pDisplay, Promotor: CMV Resistenzgen: Ampicillin für ILTV- gC und VLP-Rückgrat | Zbinden, 2015 |
| pDgD307 | Expressionsplasmid pDisplay, Promotor: CMV Resistenzgen: Ampicillin für ILTV- gD und VLP-Rückgrat | Zbinden, 2015 |
| pDgGA1-26 | Expressionsplasmid pDisplay, Promotor: CMV Resistenzgen: Ampicillin für ILTV- gG und VLP-Rückgrat | Zbinden, 2015 |

3.4 Primer

Bezugsquelle:

Microsynth AG, Balgach CH, www.microsynth.ch

Tabelle 3-4 Oligonukleotide zur Klonierung von ChIL-2 bzw. ChIL-18 in die Expressionsvektoren pcDNA3_3 TOPO und pCAGGS.

| Name | Nukleotidsequenz |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Klonierung von ChIL-2/-18 in pcDNA3_3 TOPO | |
| ChIL-18(+) | 5'-ATG AGC TGT GAA GAG ATC GCA GTG TGT GCA GTA CGG CTT AGA G-3' |
| ChIL-18(-) | 5'-TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG TAG GTT GTG CCT TTC ATT ATG-3' |
| ChIL-2(+) | 5'-ATG ATG TGC AAA GTA CTG ATC TTT GGC TGT ATT TCG GTA GCA ATG C-3' |

| | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------|
| ChIL-2(-) | 5'-TTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG TTT TTG CAG ATA TCT CAC AAA GTT GG-3' |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------|

Klonierung von ChIL-2/-18 in pCAGGS

| | |
|--------------|----------------------------------------------|
| EcoChIL-2(+) | 5'-GCA AAG AAT TCA TGA TGT GCA AAG TAC TG-3' |
|--------------|----------------------------------------------|

| | |
|--------------|----------------------------------------------|
| EcoChIL-2(-) | 5'-GGA GTG AAT TCT TAA TGG TGA TGG TGA TG-3' |
|--------------|----------------------------------------------|

| | |
|---------------|-------------------------------------------------|
| XhoChIL-18(+) | 5'-AAT TCC TCG AGA TGA GCT GTG AAG AGA TCG C-3' |
|---------------|-------------------------------------------------|

| | |
|---------------|----------------------------------------------|
| XhoChIL-18(-) | 5'-AAT TCC TCG AGT TAA TGG TGA TGG TGA TG-3' |
|---------------|----------------------------------------------|

qRT-PCR aus Organ- und Blutproben

| | |
|------------|---------------------------------------|
| ChIL-2_for | TTG GAA AAT ATC AAG AAC AAG ATT CAT C |
|------------|---------------------------------------|

| | |
|------------|--------------------------------|
| ChIL-2_rev | TCC CAG GTA ACA CTG CAG AGT TT |
|------------|--------------------------------|

| | |
|--------------|---------------------------------------------|
| ChIL-2_probe | FAM-ACT GAG ACC CAG GAG TGC ACC CAG C-TAMRA |
|--------------|---------------------------------------------|

| | |
|-------------|-------------------------------|
| ChIL-18_for | AGG TGA AAT CTG GCA GTG GAA T |
|-------------|-------------------------------|

| | |
|-------------|---------------------------|
| ChIL-18_rev | ACC TGG ACG CTG AAT GCA A |
|-------------|---------------------------|

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| ChIL-18_probe | HEX-CCG CGC CTT CAG CAG GGA TG-BHQ-1 |
|---------------|--------------------------------------|

| | |
|-------------|---------------------------|
| avGAPDH_for | GGA GTC AAC GGA TTT GGC C |
|-------------|---------------------------|

| | |
|-------------|-------------------------|
| avGAPDH_rev | TTT GCC AGA GAG GAC GGC |
|-------------|-------------------------|

| | |
|---------------|-----------------------------------------|
| avGAPDH_probe | FAM-TAT TGG CCG CCT GGT CAC CAG G-TAMRA |
|---------------|-----------------------------------------|

3.5 Verwendete Kits

Tabelle 3-5 Kits zur Extraktion, Purifikation und für diagnostische Tests und ihre Herkunft.

| Kit | Verwendung | Bezugsquelle |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit | Endotoxinfreie Plasmidpräparation | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| HA-tagged Protein PURIFICATION KIT | Konzentrationsbestimmung von Proteinen | MBL, Medical and Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya www.mbl.co.jp/e/ |
| HiPurA™ All Blood RNA Purification Kit | Isolierung von RNA aus Citratblut | Himedia, Mumbai www.himedialabs.com |
| Micro BCA™ Protein Assay Kit | Konzentrationsbestimmung von Proteinen | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up | Aufreinigung von DNA aus Agarosegel | Macherey-Nagel, Oensingen CH www.mn-net.com |
| NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up | Aufreinigung von DNA | Macherey-Nagel, Oensingen CH www.mn-net.com |
| NucleoSpin® RNA Kit | Isolierung von RNA aus Gewebe | Macherey-Nagel, Oensingen CH www.mn-net.com |
| pcDNA™ 3.3-TOPO® TA Cloning Kit | Klonierung | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| Poultry Immunoassays Infectious Laryngotracheitis Antibody Test Kit | Nachweis von Antikörpern gegen ILTV-Antigen | BioChek B. V., Reeuwijk www.biochek.com |
| PureLink® RNA Mini Kit | Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen | Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| Qiagen Plasmid Plus Midi Kit | Plasmidpräparation | QIAGEN AG, Hombrechtikon CH www.qiagen.com |
| QIAprep® Spin Miniprep Kit (250) | Plasmidpräparation | QIAGEN AG, Hombrechtikon CH www.qiagen.com |
| QuantiTect Probe RT-PCR Kit | qRT-PCR | QIAGEN AG, Hombrechtikon CH www.qiagen.com |
| RIPA Lysis Buffer System (w/out PMSF) | Zelllyse | Santa Cruz Biotechnology, Dallas www.scbt.com |
| ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit | Bestimmung des Endotoxingehalts von Plasmidpräparationen | GenScript, Piscataway www.genscript.com |

3.6 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 3-6 Bakterienstämme, ihr Genotyp und ihre Herkunft.

| Stamm | Genotyp | Bezugsquelle |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> XL1-Blue Competent Cells | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIq</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)] | Stratagene, San Diego (USA) www.stratagene.com |
| <i>E. coli</i> TOP10 | F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> | Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| <i>E. coli</i> TOP10 F' | F' { <i>lacIq</i> , Tn10(TetR)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> | Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| <i>E. coli</i> XL10-Gold Ultracompetent Cells | Tet ^r D(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> Hte [F' <i>proAB lacIq</i> Δ ZDM15 Tn10(Tet ^r) Amy Cam ^r] | Stratagene, San Diego (USA) www.stratagene.com |

3.7 Verwendete Zelllinie

Tabelle 3-7 Zelllinien, ihre Eigenschaften und ihre Herkunft.

| Zelllinie | Eigenschaften | Bezugsquelle |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Leghorn Male Hepatoma (LMH) | Chicken Liver Hepatocellular carcinoma cell line Epitheliale, permanente Zelllinie aus einem durch Diethylnitrosamin induzierten hepatozellulärem Karzinom eines Leghorn-Hahnes der Linie LM gewonnen (Kawaguchi, Nomura, Hirayama, & Kitagawa, 1987) | CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim DE www.clsgmbh.de |

3.8 Antikörper

Tabelle 3-8 Antikörper und ihre Herkunft.

| Antikörper | | Bezugsquelle |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Western Blot | | |
| Primärantikörper | eingesetzte Konzentration | |
| m- α -ChIL-2 | 1:200 | United States Biological, Salem www.usbio.net |
| m- α -HA (Purified anti-HA.11 Epitope Tag Antibody) | 1:1000 / 1:1500 | BioLegend, San Diego www.biolegend.com |
| m- α -His (Mouse monoclonal antibody anti-His) | 1:1000 | SignalChem, Richmond www.signalchem.com |
| rab- α -myc (c-Myc-tag antibody, pAB, Rabbit) | 1:1000 | GenScript, Piscataway www.genscript.com |
| rab- α -p30 (Rabbit polyclonal antibody to MLV p30) | 1:2000 | Icosagen SA, Tartu www.icosagen.com |
| α -His-HRP-DirekT | 1:5000 | MBL, Medical and Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya www.mbl.co.jp/e/ |
| Sekundärantikörper | | |
| α -rab-HRP (Anti-rabbit IgG, HRP- linked Antibody) | 1:1000 | Cell Signalling Technology, Inc., Danvers www.cellsignal.com |
| goat α -mouse-IgG-HRP | 1:1000 | Santa Cruz Biotechnology, Dallas www.scbt.com |
| ELISpot | | |
| m- α -ChINF- γ | 500 μ g/ml | Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| biotinylated m- α -ChINF- γ | 155 μ g/ml | Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific www.thermofisher.com |
| Elektronenmikroskopie | | |
| Goat- α -mouse IgG gold 10 nm | | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs CH www.sigmaaldrich.com |
| FACS | | Angefärbte Zellen |
| Ms mAb α -CD3 (FITC) | T-Lymphozyten | Acris Antibodies GmbH, Herford www.acris-antibodies.com |

| | | |
|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------------------------------|
| Mouse IgG1 α -CD4-PE | T-Helferzellen | Acris Antibodies GmbH, Herford www.acris-antibodies.com |
| Mouse IgG1 α -CD8-PE | zytotoxische T-Lymphozyten | Acris Antibodies GmbH, Herford www.acris-antibodies.com |
| VLP-Quantifizierung | | |
| Mouse α -myc.A7 | 1:500 | |
| ELISA gG | | |
| Mouse α -ChIgY | 1:5000 | ProSci Inc., Fort Collins www.prosci.com |

3.9 Virus

Tabelle 3-9 ILT-Virusstämme.

| Virus | Herkunft |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ILTV aus CAM-Flüssigkeit 2015-10-20 | NRGK, 2015 |
| Isolat des virulenten A-489 ILTV Stamms | Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems, Deutschland |

3.10 Mikrobiologische Methoden

3.10.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Inoue Transformationspuffer

10,88 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ (55 mM)
2,2 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (15 mM)
18,65 g KCl (250 mM)
20 ml PIPES (10 mM, pH 6,7)
ad 1 l H_2O
Sterilfiltration durch 0,45 μm -Filter

LB-Amp-Medium

5 ml LB-Bouillon
5 μl Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Kompetenz bezeichnet die Fähigkeit von Zellen, freie DNA aus dem sie umgebenden Medium aufzunehmen, und ist damit Voraussetzung für die Transformation von Bakterien.

Ein 100 μl umfassendes Aliquot der gewünschten Bakterienzellen wurde über Nacht bei 37 °C in 5 ml LB-Bouillon unter Schütteln vermehrt. Die Hälfte dieser Kultur wurde am folgenden Tag in 50 ml LB-Bouillon überführt und weiterhin bei 37 °C unter Schütteln bebrütet. Sobald eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,55 erreicht war, wurde die Bakteriensuspension für 10 Minuten auf Eis gestellt und anschließend mit 1000 x g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das verbleibende Zellpellet in 4 ml eiskühlem Inoue-Transformationspuffer resuspendiert und unter stetem Schwenken des Gefäßes tropfenweise mit 300 μl DMSO versehen. Aliquots zu 100 μl wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und die nun chemisch kompetenten Bakterien bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.10.2 Transformation kompetenter Bakterien

Die nicht-virale Übertragung von freier DNA in kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet.

Zur Einschleusung von Plasmid-DNA in Bakterien wurde ein 100 μl umfassendes Aliquot Bakterienzellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 0,5 – 1 ng der gewünschten Plasmid-DNA und vorsichtigem Mischen erfolgte eine 30-minütige Inkubation ebenfalls auf Eis. Danach wurde die Bakteriensuspension für 30 Sekunden einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Durch

diesen sogenannten „Hitzeschock“ wird die Aufnahme der DNA in die Bakterienzelle gewährleistet. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium wurden die Bakterien bei 37 °C für eine Stunde unter Schütteln bei 225 – 250 rpm inkubiert und verschiedene Volumina (zwischen 50 und 200 µl) auf Ampicillin-Agarplatten (Ampicillin: 100 µg/ml) ausgestrichen. Die Inkubation bei 37 °C erfolgte über Nacht. Dies erlaubte die anschließende Selektion einer resistenten Bakterienkolonie, welche in der Folge in LB-Bouillon, die ebenfalls ein Selektionsantibiotikum (Ampicillin: 100 µg/ml) enthielt, unter denselben Wachstumsbedingungen wie zuvor geschildert, vermehrt werden konnte.

3.10.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien in Ansätzen von 5 ml bzw. 100 ml mit Selektionsantibiotikum (5 µl bzw. 100 µl) versetzter LB-Bouillon erfolgte unter Zuhilfenahme des Qiaprep Spin Miniprep Kits bzw. des Qiagen Plasmid Plus Midi Kits. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers zur Mini-DNA-Präparation (für eine Bakterienkultur von 5 ml) oder zur Maxi-DNA-Präparation (für eine Bakterienkultur von 100 ml) verfahren. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.10.4 Isolierung von Endotoxin-freier Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA nach Transformation in Bakterienzellen, welche als Adjuvans den Impfstoffpräparationen beigefügt wurde, erfolgte die Extraktion unter Zuhilfenahme des GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit von Sigma-Aldrich.

Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten entsprechend der Herstellerangaben. Als Ausgangsmaterial diente jeweils eine Bakterienkultur von 150 ml, deren optische Dichte (OD₆₀₀) bei 3 lag. Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.10.5 Bestimmung des Endotoxingehaltes

Die Kontrolle des Endotoxingehaltes nach der Isolierung von Plasmid-DNA mittels des GenElute™ HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit (Sigma-Aldrich), wie zuvor beschrieben, erfolgte mittels des ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit von GenScript entsprechend der Herstellerangaben.

3.11 Zellbiologische Methoden

3.11.1 Kultivierung von adhärenenten Zelllinien

Die Kultivierung der adhärenent wachsenden Zelllinie LMH erfolgte in Waymouth's Medium unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FBS) in einem Inkubator (Heracell 240, Heraeus) bei 38 °C, 5 % CO₂ und hohem Luftfeuchtigkeitsgehalt (> 90 %).

Im Abstand von je drei bis vier Tagen wurden die Zellen im Verhältnis von 1:6 ausgedünnt. Zur Teilung wurde das Medium vollständig abgenommen. Die Zellen wurden zur Entfernung von FBS-Resten und Zellfragmenten mit vorgewärmtem PBS gewaschen, mit Trypsin-/EDTA-Lösung bedeckt und über 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die abgelösten Zellen in PBS resuspendiert, der gewünschte Zellanteil wurde in Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen bei 37 °C weiterkultiviert, wohingegen der Rest verworfen wurde. Nach maximal 30 Passagen wurden die Zellen entsorgt.

3.11.2 Auftauen von eukaryontischen Zellen

Die Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie möglichst rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und unmittelbar nach dem Auftauen in 9 ml PBS überführt und zentrifugiert (10 min, 300 x g, 21 °C). Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml frischem Medium resuspendiert und unter Zusatz von 50 µl Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml) zur weiteren Kultivierung in eine Zellkulturflasche (T25) überführt.

3.11.3 Transfektion

Als Transfektion wird das Einbringen fremder DNA in eukaryontische Zellen bezeichnet. Die DNA kann dabei stabil ins Wirtsgenom eingebaut werden oder als Episom zeitweilig – transient – im Zellkern vorliegen. Zum Einschleusen der DNA wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der Lipofektion verwendet.

Die Transfektion wurde mit einem zu 80-90 % konfluenten Zellrasen durchgeführt. Das Kulturmedium wurde unmittelbar vor der Transfektion durch reines Waymouth's-Medium ohne Zusätze von Antibiotika oder FBS ersetzt, um einer zytotoxischen Wirkung bzw. einem negativen Einfluss auf die Transfektionskomplexe vorzubeugen.

Ein Transfektionsansatz umfasste – beispielhaft für Zellen auf einer Fläche von $78,5 \text{ cm}^2$ – 1,5 ml Medium mit reduziertem Serumanteil (Opti-MEMTM, Gibco Thermo Fisher Scientific), 15 µg DNA und 40 µl Transfektionsreagenz (TransIT[®]-2020, Mirus). Für Ansätze in sich davon unterscheidendem Maßstab wurde die Transfektionsmenge proportional an das Flächenmaß des entsprechenden Zellrasens angepasst.

Tabelle 3-9 Transfektionsansätze.

| | 10 cm-Zellkulturschale (VLPs) | 10 cm-Zellkulturschale (Glykoproteine) | 6-Loch-Platte |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------|---------------------|
| Grundfläche | 78,5 cm ² | 78,5 cm ² | 9,6 cm ² |
| OptiMEM | 1,5 ml | 1,5 ml | 250 µl |
| pLgag | 7 µg | - | - |
| Plasmid Glykoprotein | 8 µg | 15 µg | 250 ng |
| TransIT-2020 | 40 µl | 40 µl | 7 µl |
| Penicillin/ Streptomycin | 60 µl | 60 µl | 10 µl |

Nach 20-minütiger Inkubation wurde das Gemisch auf die Zellen getropft und 4 bis 6 Stunden danach durch Zusatz von 60 µl Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml) vor bakterieller

Besiedelung geschützt. Die Gewinnung der Transfektionsprodukte erfolgte nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und bei regulierter Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator (Heracell 240, Heraeus).

3.11.4 Immunogoldmarkierung und Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Analyse erlaubt die visuelle Detektion der durch Transfektion gewonnenen VLPs.

Hierfür wurden je 10 µl der konzentrierten VLPs auf mit Parlodion/Carbon beschichteten Kupfergittern aufgebracht. Nach einer Adsorptionsdauer von 2 Minuten wurde der Puffer entfernt und die Gitter viermal mit einer Lösung aus PBS mit einem Anteil von 10 % Ziegenserum für je 1 Minute gewaschen. Jedes der Gitter wurde im Anschluss mit dem Primärantikörper (Maus-anti-Myc) in einer 1:50-Verdünnung in PBS mit einem Ziegenserumanteil von 1 % für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch erneutes, fünfmaliges Waschen mit PBS/ 10 % Ziegenserum für je 2 Minuten entfernt. Als Sekundärantikörper wurde ein mit Gold konjugierter Anti-Maus-Antikörper in einer 1:50-Verdünnung in PBS mit einem Anteil von 0,1 % BSA verwendet und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten mehrere Waschschritte: zweimal je 1 Minute mit PBS/ 0,1 % BSA, fünfmal je 1 Minute mit PBS und viermal je 1 Minute mit Wasser. Danach wurden die Gitter 20 Sekunden mit 3 % Uranylacetat behandelt. Die überschüssige Flüssigkeit wurde anschließend entfernt und die Gitter luftgetrocknet. Die Betrachtungen im Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM10) fanden bei einer Beschleunigungsspannung von 85 kV – 250 kV statt.

3.12 Molekularbiologische Methoden

3.12.1 Gewinnung von VLPs

Saccharoselösung, 20 %

PBS

20 % Saccharose

Zur Konzentration und Reinigung der VLPs wurden diese durch ein 20 %-iges Saccharose-Kissen zentrifugiert.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Überstände der transfizierten Zellen gesammelt und durch einen 0,45 µm-Spritzenfilter (Sarstedt) geleitet. In einem Ultrazentrifugationsröhrchen (Tube Thinwall Ultra Clear, Beckman Coulter) wurden 800 µl einer 20 %-igen Saccharoselösung vorgelegt und diese mit dem auf zwei Dezimalen genau austarierten VLP-haltigen Medium überschichtet. Dadurch wurde ein einschichtiger, diskontinuierlicher Gradient geschaffen, entlang dessen die VLPs während der zweistündigen Zentrifugation bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 45 000 rpm (Discovery M120 SE, Sorvall, Thermo Fisher Scientific) am Boden sedimentierten und anschließend über Nacht bei 4 °C unter konstanter Bewegung in PBS resuspendiert werden konnten. Die gereinigten VLPs wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.12.2 Isolierung von RNA aus eukaryontischen Zellen

Zur Isolierung von RNA aus LMH-Zellen wurde das PureLink[®] RNA Mini Kit von Ambion[®], life technologies verwendet. Es wurde nach den Anweisungen des Herstellers verfahren. Als Ausgangsmaterial dienten 1×10^6 bis 5×10^6 transfizierte LMH-Zellen. Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen, manuell mit einem Zellschaber abgelöst und durch Zentrifugation bei $1800 \times g$ für 7 Minuten pelletiert. Durch Zugabe von 500 µl Lysierungspuffer und 5 µl 2-Mercaptoethanol erfolgte der Zellaufschluss gefolgt von einer Homogenisierung der Zellen mittels wiederholter Passage durch eine 20-Gauge-Kanüle (Sterican, Braun). Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.12.3 Isolierung von RNA aus Gewebe

Zur Isolierung von RNA aus tierischem Gewebe wurden die Gewebe zunächst durch Verwendung des Tissue Lyser II (Qiagen) mechanisch aufgeschlossen. Anschließend wurde die enthaltene RNA mit dem NucleoSpin[®] RNA Kit von Macherey-Nagel extrahiert. Dabei wurde nach den Anweisungen des Herstellers verfahren. Als Ausgangsmaterial dienten je 30 mg der folgenden Gewebe:

serumfreier Anteil der Blutproben von Tag 7, 16, 21, 24, 29 und 31 (in Versuch B)

bzw. Citrat-Vollblut der Tage 11, 18, 22, 25, 29, 32 und 36 (in Versuch C)

M. iliotibialis dexter

M. iliotibialis sinister

Leber

Milz

isolierte Milzlymphozyten

Bursa fabricii

Pankreas

Herz

Lunge

Niere

Caecalfollikel

Thymus

Zur Extraktion von RNA aus Citrat-Vollblut wurden die Proben vor den obig geschilderten Schritten im Verhältnis 1:6 mit HiPurA RBC-Lysierungspuffer (1x) gemischt und für zehn bis 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 400 x g über 10 Minuten bei 4 °C wurde ein Zellpellet gewonnen, welches nach Entfernen des Überstandes erneut in HiPurA RBC-Lysierungspuffer (1x) im Verhältnis 1:3 gelöst und abermals zentrifugiert wurde.

Die erhaltenen RNA-Extrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.12.4 Restriktion von Plasmid-DNA

Die Restriktion von DNA basiert auf der Eigenschaft von Restriktionsendonukleasen, spezifisch an definierten DNA-Sequenzen zu schneiden, welche in der Regel zwischen vier und sechs Basen lang sind.

Für einen analytischen Verdau wurden 500 ng DNA pro Ansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Für einen präparativen Verdau wurden max. 1,5 µg in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt, welcher jeweils über einen Zeitraum von einer bis zu 12 Stunden bei 37 °C unter Schütteln bei 225 – 250 rpm stattfand.

3.12.5 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

10x DNA Ladepuffer

1,5 g Ficoll 400
2 ml EDTA
0,5 ml Bromphenolblau
ad 7 ml H₂O

TAE-Puffer

0,4 M Tris
0,1 M Na₂EDTA (pH 8,0)
0,2 M Eisessig

Gel, 1 %

1 g Agarose
100 ml TAE-Puffer
erhitzen bis zum Siedepunkt
20 µl Ethidiumbromid

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsfragmente und PCR-Produkte wurden Gele mit einem Agaroseanteil von 1 % verwendet und über 1,5 Stunden einem Gleichstrom von 100 V, 300 mA und 100 W ausgesetzt. Die Proben wurden je im Verhältnis 1:2 mit DNA-Ladepuffer versetzt.

Die Analyse erfolgte unter UV-Licht (AlphaImager, Alpha Innotech) durch Vergleich mit dem Bandenmuster der entsprechenden Referenzmarker. War die Weiterverwendung eines spezifischen Fragments vorgesehen, wurde die entsprechende Bande mit einer Skalpellklinge aus dem Gel geschnitten.

3.12.6 DNA-Aufreinigung

Um DNA aus enzymatischen Reaktionsansätzen bzw. PCR-Produkte in reiner Form zu erhalten wurde das NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) verwendet. Dabei wurde nach den Anweisungen des Herstellers verfahren.

3.12.7 Dephosphorylierung von DNA mittels Intestinaler Phosphatase des Kalbs (Calf Intestinal Phosphatase, CIP)

Um die Eigenligation des Klonierungsvektors vor Einbau des gewünschten DNA-Fragments zu verhindern, wurden die 3'- und 5'-Enden des geschnittenen Plasmids mittels CIP dephosphoryliert, wodurch das Plasmid in linearisierter Form verbleibt.

Hierzu wurde die Plasmid-DNA während 30 Minuten bei 37 °C mit 0,5 µl des Enzyms und 5 µl CutSmart-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl inkubiert und anschließend per PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

3.12.8 TOPO-Cloning

Beim TOPO-Cloning macht man sich die Eigenschaft der Typ-I-DNA-Topoisomerase (Topo) zunutze, welche einerseits dazu in der Lage ist, an einen DNA-Doppelstrang zu binden und diesen spezifisch nach der Sequenz 5'-CCCTT zu öffnen, wobei ein einzelner Thymidin-Überhang entsteht. Andererseits werden darüber hinaus die freigewordenen Enden des Vektors mit dem 5'-OH-Ende der einzufügenden DNA verknüpft. Somit entfällt einerseits die Inkubation mit Ligase, andererseits ist es nicht nötig, dass die Nukleotidsequenzen der zu ligierenden DNA-Abschnitte komplementäre Basenfolgen aufweisen.

Das TOPO-Cloning wurde unter Verwendung des pcDNA[™] 3.3-TOPO[®] TA Cloning Kit von Invitrogen, life technologies durchgeführt. Hierbei wurde nach den Anweisungen des Herstellers verfahren. Um die Ausbeute an transformierten Bakterien bei der Transformation zu erhöhen, wurde dem Reaktionsansatz, bestehend aus 2 µl PCR-Produkt, 2 µl sterilem Wasser und 1 µl TOPO-Vektor, vor der zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur 1 µl der im Kit enthaltenen Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂) beigelegt.

3.12.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde photometrisch mit dem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) bestimmt.

Die Fähigkeit von Nukleinsäuren, Licht zu absorbieren, beruht auf dem Vorhandensein eines π -Elektrodensystems innerhalb der aromatischen Ringe der Basen. Das Absorptionsmaximum einer reinen Nukleinsäurelösung liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm, wohingegen das Absorptionsmaximum von Proteinen, Phenolen und anderen Kontaminanten bei oder um 280 nm liegt. Somit kann die Reinheit der Probe durch die Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm definiert werden.

Im Hinblick auf die Reinheit von RNA wurden hierbei Grenzwerte von mindestens 2,0 im 260/280-Verhältnis, für DNA von mindestens 1,8 vorausgesetzt.

3.12.10 Ligation

Die Berechnung des korrekten Verhältnisses zwischen Vektorrückgrat und Insertionssequenz basierte auf der folgenden Formel:

$$\frac{\text{Länge des Inserts (bp)}}{\text{Länge des Vektors (bp)}} \times \text{ng Vektor} \times \frac{3}{1} \left(\text{Quotient} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \right) = \text{ng benötigtes Insert}$$

Dies resultierte in einem Reaktionsansatz bestehend aus 30 ng Vektorrückgrat und einer je nach Länge der Insertions-DNA variierenden Menge von 8 ng bis 11 ng. Dieser wurde mit 1 μ l Ligasepuffer, 0,5 μ l T4-Ligase und der entsprechenden Menge Wasser bis auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l komplettiert.

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der nur das Vektorrückgrat und die Ligase enthielt (Kontrolle der Eigenligation), sowie ein zweiter Ansatz, der ausschließlich das Vektorrückgrat umfasste (Kontrolle von möglicherweise enthaltenem, ungeschnittenem Vektor).

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C. Das Produkt wurde anschließend in Bakterien transformiert.

3.12.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, DNA unter Verwendung des Enzyms DNA-Polymerase *in vitro* zu vervielfältigen.

Diese Methode wurde verwendet, um die auf diese Weise erhaltenen DNA-Fragmente per Klonierung in einen Vektor einzufügen.

Reaktionsansatz:

| | |
|---------|------------------------|
| 50 ng | DNA |
| 4 µl | Primer (+), 10 µM |
| 4 µl | Primer (-), 10 µM |
| 10 µl | Phusion HF Buffer |
| 2 µl | dNTPs, 10 mM |
| 1 µl | Phusion DNA Polymerase |
| ad 50µl | H ₂ O |

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

Tabelle 3-10 Temperatur- und Zeitverlauf eines PCR-Laufes.

| | | | |
|-----------------------------|-------|--------|----------------|
| Denaturierung | 98 °C | 5 min | 25 – 30 Zyklen |
| Denaturierung | 98 °C | 30 sec | |
| Annealing der Primer | 55 °C | 30 sec | |
| Elongation | 72 °C | 1 min | |
| Elongation | 72 °C | 10 min | |
| | 4 °C | ∞ | |

Die Annealing-Temperatur ist hierbei von den gewählten Primern abhängig. Die Elongationszeit wird von der Größe des zu amplifizierenden Fragments bestimmt.

Zur Amplifikation wurden Desoxyribonukleotide der Firma Qiagen verwendet. Als Ausgangsmaterial diente cDNA aus Hühnermilzzellen. Die in der PCR eingesetzten Primer

weisen eine Länge von etwa 20 Nukleotiden auf und wurden so gewählt, dass sie weder Selbst- noch Kreuz-Dimere und keine Sekundärstrukturen ausbilden. Die Reaktion fand in einem Thermocycler (2720 Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific) statt.

Im Anschluss an die Klonierung wurden sämtliche Proben durch die Firma Microsynth, Balgach sequenziert und durch Abgleich mit der zugehörigen Referenzsequenz auf ihre Korrektheit geprüft.

3.12.12 Addition von 3' A-Überhängen bei der Klonierung in pcDNA3_3 TOPO

Da die beim TOPO-Cloning (vgl. Kapitel „TOPO-Cloning“) verwendete Topoisomerase einen Thymin-Überhang am Vektor generiert, wird der Insertionssequenz entsprechend ein 3' A-Überhang angefügt. Während dieser von der Taq-Polymerase automatisch generiert wird, muss bei Verwendung von Phusion DNA-Polymerase (mit besserer ‚Proof-reading‘-Funktion) das Adenin separat angehängt werden, da diese ‚blunt-ends‘ (‚glatte Enden‘) bildet.

Hierzu wurden die eisgekühlten Proben nach Zugabe von 0,1 µg Taq-Polymerase in einer 1:10-Verdünnung mit Taq-PCR-Puffer über 10 Minuten bei 72 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte erneut auf 4 °C gekühlt.

3.12.13 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Das Prinzip der qRT-PCR entspricht dem der konventionellen PCR. Allerdings erlaubt die qRT-PCR, die RNA-Menge eines bestimmten Gens in der Ausgangsprobe quantitativ zu bestimmen. Hierfür wird in einem der eigentlichen PCR vorgeschalteten Schritt zunächst die aufgereinigte RNA der Probe durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Erst anschließend wird die Taq-Polymerase durch Temperaturerhöhung aktiviert, um dann die nun vorhandene DNA zu amplifizieren.

Zur Quantifizierung der ursprünglich enthaltenen Menge eines gesuchten Gens wurde eine sogenannte TaqMan-Sonde verwendet, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher markiert ist. Die verwendete Polymerase besitzt zusätzlich eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Somit wird die Sonde während der Gegenstrangsynthese abgebaut und folglich der Quencher entfernt, wodurch Fluoreszenz „freigesetzt“ wird, die bei der Amplifikation proportional zunimmt und nach jedem einzelnen Zyklus (in Echtzeit) gemessen wird.

Reaktionsansatz:

| | |
|---------|------------------------------|
| 5 µl | Nukleotidverdünnung |
| 12,5 µl | QuantiTect RT-PCR Master Mix |
| 1 µl | Primer (+), 10 µM |
| 1 µl | Primer (-), 10 µM |
| 0,25 µl | Probe, 10 µM |
| 0,25 µl | QuantiTect RT Mix |
| 5 µl | DEPC H ₂ O |

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

Tabelle 3-11 Temperatur- und Zeitverlauf eines qRT-PCR-Laufes.

| | | | |
|---------------------------------------------|-------|--------|-----------|
| Aktivität der Reversen Transkriptase | 50 °C | 30 min | 40 Zyklen |
| Denaturierung | 95 °C | 5 min | |
| Denaturierung | 95 °C | 20 sec | |
| Annealing der Primer | 52 °C | 1 min | |
| Elongation | 72 °C | 1 min | |

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma Microsynth, Balgach. Die Reaktion fand in einem Thermocycler (7500 Fast Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific) statt.

Alle Arbeitsschritte wurden an einem speziellen PCR-Arbeitsplatz durchgeführt, welcher zuvor durch Bestrahlung mit UV-Licht dekontaminiert wurde. Alle Proben wurden in doppeltem Ansatz untersucht.

Um das Ergebnis der qRT-PCR zu beurteilen, wurde der CT-Wert (cycle threshold, Schwellenwert der PCR-Zyklen) herangezogen. Dieser beschreibt den Beginn der exponentiellen Phase einer Kurve. Bei der PCR ist dies der Teil, an dem die Fluoreszenz erstmals über den Hintergrundwert steigt. Zum Vergleich dienten standardisierte Verdünnungen von pcDNA-ChIL-2 bzw. pcDNA-ChIL-18, welche in den Kopienzahlen 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 und 100 parallel eingesetzt wurden.

3.13 Proteinbiochemische Methoden

3.13.1 Gewinnung von Proben für Western Blots

3.13.1.1 Gewinnung proteinhaltiger Zellkulturüberstände

Nach 48-stündiger Transfektion wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und anschließend durch einen 0,45 µm-Spritzenfilter (Sarstedt) filtriert.

3.13.1.1.1 Zellyse mittels RIPA-Puffer

RIPA-Lysierungspuffer (Radio Immuno Precipitation Assay)

- 100 Teile RIPA
- 1 Teil PMSF
- 1 Teil Protease-Inhibitor
- 1 Teil Orthovanadat (100 mM)

Nach Abnahme des Kulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen, manuell mit einem Zellschaber abgelöst und durch Zentrifugation bei 1800 x g für 5 bis 10 Minuten bei 21 °C pelletiert und anschließend durch RIPA-Puffer lysiert.

Hierfür wurden abhängig von der Größe des Zellpellets, 30 µl bis 60 µl mit Protease-Inhibitoren (u. a. PMSF, ein Serin-Protease-Hemmer und Ortho-Vanadat, ein Phosphatase-Hemmer) versetzter RIPA-Puffer zur Lyse verwendet. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 4 °C und anschließender Zentrifugation bei 21 000 x g über 15 Minuten bei 4 °C konnte der den Proteinanteil enthaltende Überstand abgenommen und für weitere Analysen verwendet werden.

3.13.1.1.2 Isolierung von Protein mittels HA-Markierung

Das HA-tagged Protein PURIFICATION KIT (MBL) wurde entwickelt, um Proteine zu isolieren, die das HA-Epitop auf der Oberfläche tragen. Dieses ist abgeleitet vom Humanen Influenza-Hämagglutinin (HA). Hierbei handelt es sich um eine gebräuchliche Markierungssequenz.

Bei der Verwendung des Kits wurde nach den Anweisungen des Herstellers verfahren. Als

Ausgangsmaterial dienten die per Transfektion in LMH-Zellen produzierten Glykoproteine gB, gC, gD und gG des ILT-Virus. Die Zellen einer Zellkulturpetrischale (100 x 20 mm, Bioswisstec) wurden abgelöst und bei 400 x g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und anschließend in 1000 µl Lysierungspuffer lysiert. Im Anschluss daran wurde das Zelllysats mit Anti-HA-Antikörper-beschichteten Perlen versetzt, auf die Säule pipettiert und 1 Stunde rotierend bei 4 °C inkubiert. Nach drei Wasch- und Zentrifugationsschritten (15 000 x g, 10 Sekunden, 4 °C) erfolgte das Eluieren durch Hinzufügen eines Elutionspeptids, welches durch seine hohe Affinität die gebundenen Proteine von den Anti-HA-Antikörper-beschichteten Perlen löst.

Alle Filtrate wie auch die aufgereinigte Peptidlösung wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

3.13.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.13.1.2.1 Micro BCA™ Protein Assay Kit

Die Messung geringer Proteinkonzentrationen (0,5 – 20 µg/ml) wurde mit dem Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific) durchgeführt. Dabei wurde nach den Anweisungen des Herstellers verfahren.

Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} durch Proteine in alkalischer Umgebung, welches wiederum durch Chelatbildung zwischen dem reduzierten Cu^+ mit Bicinchoninsäure (BCA) unter Bildung eines Farbumschlags nachgewiesen werden kann.

Die zu messenden Proteinkonzentrationen wurden mittels Abgleich mit einer Standardverdünnungskurve aus Bovinem Serumalbumin (BSA) durch Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm ermittelt.

3.13.1.2.2 Methode nach Bradford

Die Bestimmung höherer Proteinkonzentrationen erfolgte durch die Methode nach Bradford unter Verwendung von Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio Rad). Diese basiert auf dem Nachweis des Farbumschlags einer sauren Coomassie® Brilliant Blue G-250-Lösung durch Bindung an basische und aromatische Reste von Aminosäuren. Das Absorptionsmaximum verlagert sich dadurch von einer Wellenlänge von 465 nm zu 595 nm.

Die zu messenden Proteinkonzentrationen wurden mittels Abgleich mit einer Standardverdünnungskurve aus BSA ermittelt.

3.13.1.3 Säure-Präzipitation

Trichloressigsäure-Lösung

500 g Trichloressigsäure (Trichloroacetic acid, TCA)
350 ml dH₂O

Der Begriff Säure-Präzipitation bezeichnet ein Verfahren zur Konzentrierung von Proteinen durch Fällung im sauren Milieu. Hierzu wurde 1 Teil Trichloressigsäure (TCA, 100 %) mit 4 Teilen der Proteinprobe versetzt. Nach 10-minütiger Inkubationsdauer bei 4 °C wurden die gefällten Proteine durch Zentrifugation bei 21 000 x g über 5 Minuten sedimentiert und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde anschließend in 200 µl kaltem Aceton resuspendiert und erneut bei 21 000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung der geschilderten Schritte wurde das Pellet bei 95 °C unter Verdampfen des Acetons getrocknet.

Die auf diese Weise erhaltenen, hochkonzentrierten Proteine konnten so in höherdosierter Form im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden.

3.13.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

6x Ladepuffer (Lämmli)

5 ml Glycerin, 87 %
2,5 ml 2-Mercaptoethanol
15 ml Natriumdodecylsulfat, 10 %
6,25 ml Upper Tris
12,5 mg Bromphenolblau
ad 50 ml H₂O

Laufpuffer

100 ml Kammerpuffer, 10x
10 ml SDS, 10 %
ad 1000 ml H₂O

Blockierungspuffer

5 % Magermilchpulver
in TBS, 1x

Blotpuffer

100 ml Kammerpuffer
150 ml Methanol
ad 1000 ml H₂O

Kammerpuffer, 10x

30,275 g Tris-hydroxy-methyl-aminomethan
144,134 g Glycin
ad 1000 ml H₂O

Trenngel Tris

91 g Tris
400 ml H₂O
+ HCl bis pH 8,8
20 ml SDS, 10 %
ad 250 ml H₂O

Tris-Puffer (Tris Buffered Saline, TBS)

19,8 mM Tris
500 mM NaCl

TBST (0,05 %)

TBS, 1x
0,05 % Tween 20

Sammelgel-Tris

15,25 g Tris
400 ml H₂O
+ HCl bis pH 6,8
10 ml SDS, 10 %
ad 250 ml H₂O

Trenngel

| | 8 % | 10 % | 12 % |
|---------------------------------------------|---------|---------|---------|
| H₂O | 11,7 ml | 10,0 ml | 8,4 ml |
| Acrylamid/Bis Fertiglösung, 30 % | 6,7 ml | 8,4 ml | 10,0 ml |
| Lower Tris (pH 8,8) | 6,5 ml | 6,5 ml | 6,5 ml |
| Tetramethylenethyldiamin (TEMED) | 15 µl | 15 µl | 15 µl |
| Ammoniumpersulfat, 10 % | 200 µl | 200 µl | 200 µl |

Sammelgel

- 6,5 ml H₂O
- 1 ml Acrylamid/Bis Fertiglösung, 30 %
- 2,5 ml Sammelgel Tris (pH 6,8)
- 20 µl Tetramethylenethyldiamin (TEMED)
- 40 µl Ammoniumpersulfat, 10 %

Bei der SDS-PAGE werden Proteine anhand ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld aufgetrennt. Durch Bindung von Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfat, SDS) an die Aminosäuren erhalten diese eine einheitlich negative Ladung. Die zusätzliche Denaturierung der Proteine durch fünfminütiges Erhitzen auf 95 °C, führt zur Aufhebung der Tertiär- und Quartärstruktur, sodass die linearisierten Proteine entsprechend ihrer Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse, aufgetrennt werden können.

Hierfür wurden die zu untersuchenden Proben mit 6 µl Ladepuffer (Lämmli) versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und – entsprechend der Größe der zu trennenden Proteine – auf Trenngels mit einem Acrylamidgehalt zwischen 8 % und 12 % geladen. Die Auftrennung fand im Mini-Protean 3 Electrophoresis System (Bio-Rad) bei 100 V für 1 bis 2 Stunden statt.

3.13.3 Western-Blot-Analyse und Antikörperdetektion**Entwicklungsreagenz, Enhanced chemiluminescence (ECL) Reagent**

- 1 ml Lösung A
- 0,3 µl H₂O₂, 35 %
- 100 µl Lösung B

Lösung A

- 500 ml Tris-HCl (0,1 M, pH 8,6)
- 125 mg Luminol

Lösung B

- 11 mg Para-hydroxycoumarinsäure
- 10 ml Dimethylsulfoxid

Beim Western Blot werden die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen. Dies ermöglicht den anschließenden Nachweis durch Antikörperbindung.

Um die Proteine auf einer Nitrocellulosemembran zu immobilisieren, wurden Filterpapier und Nitrocellulose (PVDF Membrane millipore, Merck) mit Blotpuffer getränkt und im Trans-blot

SD Semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad) während 2 Stunden bei 20 V vom Gel auf die Nitrocellulose übertragen. Nach erfolgtem Proteintransfer wurde die Membran zur Vermeidung unspezifischer Bindungen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer inkubiert. Die Bindung des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit dem enzymgekoppelten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von dreifachem Waschen mit TBS.

Die Detektion der enzymvermittelten Chemilumineszenz erfolgte durch Inkubation mit ECL-Substrat (enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszenz) über 2 Minuten und anschließendes Entwickeln auf Röntgenfilmfolie (Medical X-ray Film 100 NIF, Fuji) im Agfa Curix 60 (Agfa HealthCare GmbH).

3.13.4 Goldfärbung der aufgereinigten Glykoproteine

TBST (0,3 %)

Tris (20 mM)
NaCl (500 mM)
Anpassung des pH-Wertes auf pH 7,5
0,3 % Tween-20

Um die graduelle Aufreinigung der ILTV-Glykoproteine nachverfolgen zu können, wurden die Filtrate der einzelnen Waschschrte (vgl. Kapitel „Isolierung von Protein mittels HA-Markierung“) nach Auftrennung im Polyacrylamidgel und anschließendem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit kolloidalem Gold angefärbt.

Es wurden je 2 µl der Zellysate und des ersten Filtrates in einer Verdünnung von 1:10, sowie 1 µl der Filtrate der folgenden drei Waschschrte und des letztlich pur vorliegenden Glykoproteins in 10 %-igem Gel mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Nach dem Transfer der Proteingemische auf die PVDF-Membran (vgl. Kapitel „Western-Blot-Analyse und Antikörperdetektion“) wurden diese dreimal in je 100 ml TBST (0,3 %) für je 20 Minuten und dreimal in je 100 ml ddH₂O für je 2 Minuten inkubiert. Zur Färbung wurden die Membranen für 1 bis 2 Stunden in je 50 ml kolloidale Goldlösung überführt und anschließend erneut zweimal in ddH₂O gewaschen und das erscheinenden Bandenmuster visuell beurteilt.

3.13.5 Maleylierung von VLP-gB

Carbonat-Bicarbonat-Puffer (CB-Puffer)

2 ml Natriumcarbonat, nicht hydrogeniert (0,1 M)
48 ml Natriumbicarbonat (0,1 M, pH 8,5)
Anpassung des pH-Wertes auf pH 8,5 – 9,0
ad 200 ml H₂O

Durch Ausbildung einer Peptidbindung bindet Maleinanhydrid in basischem Milieu an freie Aminogruppen von Proteinen. Die biologische Auswirkung der so entstehenden Maleylgruppe besteht in der erleichterten Erkennung des gebundenen Proteins durch sogenannte Scavenger-Rezeptoren (scavenger = Plünderer), welche auf Antigen präsentierenden Zellen vorhanden sind. Dadurch kann die zelluläre Immunantwort verstärkt werden.

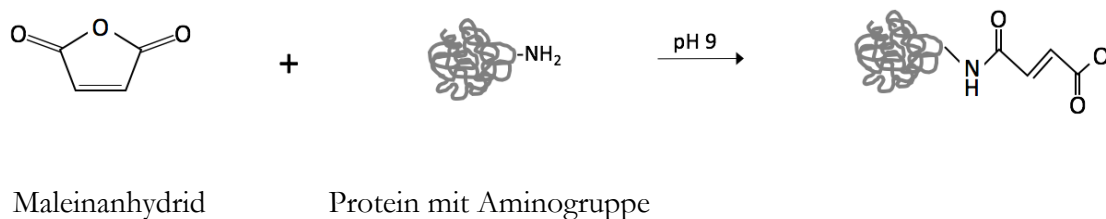


Abb. 3-1 Schematische Darstellung der Bindung von Maleinanhydrid an die freie Aminogruppe eines Proteins.

Die Maleylierungsreaktion erfolgte gemäß dem Protokoll von Butler & Hartley (1972). Dazu wurden 10 mg VLP-gB in 4 ml CB-Puffer gelöst und unter fortwährender pH-Kontrolle mit 20 mg pulverisiertem Maleylanhydrid versetzt. Schwankungen des pH-Wertes über Messwerte von 8,5 – 9,0 hinaus wurde durch Zugabe von Natriumcarbonat gepuffert.

Zur Kontrolle der Reaktion wurde der relative Anteil an freien Aminogruppen bestimmt. Dazu wurde nach dem Protokoll von Habeeb (1966) vorgegangen. Je 100 µl des zu bestimmenden Reaktionsgemischs wurden in absteigenden Verdünnungen zwischen 1:2 und 1:32 auf einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Dazu wurden in je 60 µl Natriumbicarbonat (0,1 M) gelöste Picrylsulfonsäure (2, 4, 5-Trinitrobenzensulfonsäure, 0,05 %) hinzugefügt und über 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Abbruch der Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 50 µl SDS (10 %) und 25 µl HCl (1N).

Die Auswertung der photometrischen Absorptionsmessung bei 335 nm stützte sich auf den Vergleich mit ebenfalls in Verdünnungen vorliegendem L-Lysin als Positivkontrolle.

3.14 Experimentelle Vakzinationen

3.14.1 Bestimmung der Impfstoffdosis

3.14.1.1 Relative Quantifizierung der VLP-Oberflächenglykoproteine

CB-Puffer

Carbonat-Bicarbonat-Puffer

Beschichtungspuffer

Natriumbicarbonatpuffer (50 mM, pH 9,6)

Blockierungspuffer

5 % BSA

0,1 % Tween 20

PBS

Stopppuffer

HCl (12 M)

Die antikörperbasierte Detektion der Oberflächenglykoproteine der VLPs per ELISA erlaubt deren Quantifizierung.

Die konzentrierten VLPs wurden in Beschichtungspuffer verdünnt. Desgleichen wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten Konzentrationen der aufgereinigten ILTV-Glykoproteine und von MLV p30 zur Detektion des VLP-Kapsids hergestellt. Je 100 µl der jeweiligen Verdünnung wurden in Duplikaten auf eine 96-Loch-Platte aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur, sowie anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Überstand verworfen und jede Vertiefung je zweimal mit TBS gespült und mit je 100 µl Blockierungspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und je 50 µl Primärantikörper – Maus-anti-myc-Tag zur Detektion der Glykoproteine bzw. Hase-anti-p30 zur Detektion des MLV-Kapsidproteins *gag* – zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgten drei Waschschrte mit TBST und eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit je 50 µl HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper (Anti-Maus-HRP, Anti-Hase-HRP, je 1:1000, in Blockierungspuffer). Es folgten drei Waschschrte mit TBST. Zur Detektion wurden je 100 µl TMB-Reagenz hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von je 100 µl Stopppuffer. Danach wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.14.2 Tierhaltung

Befruchtete Hühnereier der Linie Lohmann LSL der Geflügelzucht Hermenhof, Staufen stammten vom Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich. Brut und Schlupf erfolgten in der Abteilung für Geflügelkrankheiten des Instituts für Veterinärbakteriologie. Die Hühnereier wurden bei 37,6 °C und 78 % Luftfeuchtigkeit während der Vorbrut bzw. gesteigerter Luftfeuchtigkeit zum Schlupf in einem Brutautomaten (FIEM, FIEM Incubatrici snc) bebrütet und täglich automatisch gewendet.

Die Hühnerhaltung erfolgte in Gruppen zwischen je 5 bis 20 Tieren in Unterdruckisolatoren des Typs pcs isolators, model BGD2000 (TS Group Holland BV) bis zu einem Alter zwischen 14 und 42 Tagen. Den Tieren wurde handelsübliches Alleinfuttermittel (UFA) und Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt.

Die *in-vivo*-Tierversuche wurden vom Veterinäramt Zürich unter den Tierversuchsnummern ZH173/2014 und ZH004/17 genehmigt.

Haltungsbedingungen im Isolator:

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------|
| Temperatur | stufenweise von 34 °C (Schlupf) bis 20 °C |
| Luftfeuchtigkeit | 30 bis 80 % |
| Luftstrom | 25 % |
| Druck | -100 Pa bis -200 Pa |
| Lichtprogramm | stufenweise von 20 Stunden (Schlupf) auf 15 Stunden Hellphase |

3.14.3 Impfschema

3.14.3.1 *In-ovo*-Vakzination

Am 18. Bebrütungstag wurde einerseits die Vitalität der Embryonen mittels Schierlampe (Egg Lume, Brinsea) überprüft, als auch die Luftkammern und eine gefäßlose Stelle auf der Eierschale der zur *in-ovo*-Vakzination vorgesehenen Bruteier markiert.

Vor punktueller Eröffnung der Eierschale im Bereich der Luftkammer wurde deren Oberfläche mit Povidon-Jod-Lösung desinfiziert. Die Applikation des jeweiligen Impfstoffes erfolgte

mittels einer zur Gänze eingeführten Kanüle (29G ½", 0.33 x 13 mm, Sterican, Braun) mit Stichrichtung senkrecht zur Oberfläche des Eies. Die Applikation der Adjuvantien in die Luftkammer wurde durch ein teilweises Rückziehen der Kanüle in einen Bereich oberhalb der Eimembran erreicht. Die Impfstoffmenge umfasste je 100 µl.

Im Anschluss daran erfolgte die Versiegelung der Eischale mit einem Tropfen Leim und das Einlegen in den Brutautomaten (FIEM, FIEM Incubatrici snc), der nun die für die Schlupfbrut geschilderten Bedingungen aufwies.

3.14.3.2 Impfung an Tag 14

Die Wiederholungsimpfung fand am 14. Lebenstag statt. Die Applikation einer je 100 µl umfassenden Impfstoffmenge erfolgte mittels einer 25 G x 16-Kanüle (Sterican, Braun) in den rechten M. iliotibialis lateralis.

Tabelle 3-12 Zusammensetzung und Volumen pro Impfstoffdosis in Versuch B und C.
Verabreichung *in ovo* an ED 18 (B) und intramuskulär an LT 14 (B und C).

| | Komplettvakzin | Adjuvans | Negativkontrolle |
|----------------------|--------------------------|-----------|------------------|
| VLP-gG | 1 mg p30 0,3 mg gG | - | - |
| pcDNA-ChIL-2 | 60 µg* | 60 µg* | - |
| PBS | ad 100 µl | ad 100 µl | 100 µl |
| VLP-gB | 0,8 mg p30 0,25 mg gB | - | - |
| pcDNA-ChIL-18 | 60 µg | 60 µg | - |
| PBS | ad 100 µl | ad 100 µl | 100 µl |

* Zur Applikation *in ovo* wurde das Plasmid pcDNA-ChIL-2 (60 µg) mit DMSO (50 % v/v) und unvollständigem Freundschem Adjuvans (IFA – 25 % v/v) angereichert.

3.14.3.3 Impfprotokolle

Die experimentellen Vakzinationen umfassten drei Versuchsansätze:

A Im ersten Ansatz wurden die bebrüteten Hühnereier am Bebrütungstag 18 mit je 0,1 ml VLP-gB (p30 0,8 mg/ml, gB 0,24 mg/ml), VLP-gC (p30 0,5 mg/ml, gC 0,14 mg/ml), VLP-gD (p30 1,6 mg/ml, gD 0,49 mg/ml) oder VLP-gG (p30 1,6 mg/ml, gG 0,44 mg/ml) per *in-ovo*-Applikation immunisiert. Eine weitere Tiergruppe erhielt eine äquivalente Menge VLPs, auf welchen keines der Glykoproteine präsentiert wurde. Mit 0,1 ml PBS geimpfte Embryonen dienten als Kontrollgruppe.

Zur Bestimmung der humoralen Immunreaktion wurden, beginnend mit Lebenstag 14 (LT 14), wöchentlich Blutproben entnommen.

Die Hälfte der Tiere wurde an LT 14, die andere Hälfte an LT 42 euthanasiert und Organe zur Bestimmung der zellulären Immunreaktion entnommen.

B In einem zweiten Vakzinationsversuch wurde VLP-gG in Kombination mit pcDNA-ChIL-2 verabreicht. Eine weitere Gruppe erhielt ausschließlich pcDNA-ChIL-2, die Kontrollgruppe wurde mit PBS beimpft. Das Impfvolumen umfasste je 0,1 ml.

Die Applikation erfolgte zunächst am Bebrütungstag 18 *in ovo*. Das Plasmid pcDNA-ChIL-2 (60 µg) wurde mit DMSO (50 % v/v) und unvollständigem Freundschem Adjuvans (25 % v/v) in die Luftkammer appliziert. VLP-gG (p30 1 mg, gG 0,3 mg) wurde ins Amnion verabreicht.

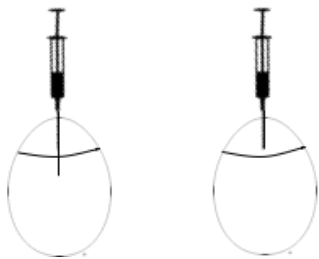


Abb. 3-2 Schema der Impfstoffapplikation *in ovo*.
Verabreichung in die Amnionhöhle (links) und in die Luftkammer (rechts).

Unvollständiges Freundsches Adjuvans (Incomplete Freund's Adjuvans, IFA) bildet eine Umhüllung der Plasmid-DNA; der Zusatz von DMSO steigert die Permeabilität von Zellmembranen und erleichtert somit die Aufnahme aus der Luftkammer des Bruteies in die Gefäße der Chorioallantoismembran und den anschließenden Transport in den Embryo. Darüber hinaus beugt die Applikation von DNA auf die Membran der Luftkammer dem vorzeitigen Abbau der DNA entgegen. Dieser wurde nicht nur im embryonierten Hühnerei beschrieben, sondern ist auch nach Applikation ungeschützter Nukleinsäuren im Säuger bekannt (Faurez, Dory, Moigne, & Jestin, 2010).

Eine Wiederholungsimpfung erfolgte am 14. LT in gleicher Dosierung intramuskulär in den M. iliotibialis lateralis.

An LT 7 wurde je eine Blutprobe von den Tieren entnommen. Darüber hinaus folgten im Anschluss an die Wiederholungsimpfung Blutabnahmen an den Tagen 16, 21, 24, 28, 32 und 35 zur Bestimmung der humoralen Immunreaktion und zur Detektion von ChIL-2.

An LT 35 wurden alle Tiere euthanasiert und Organe zur Bestimmung der zellulären Immunantwort, sowie zur Detektion von ChIL-2 entnommen.

C Ein dritter Ansatz bestand in der Applikation von mVLP-gB in Kombination mit pcDNA-ChIL-18 an LT 14 intramuskulär in den M. iliotibialis lateralis. Auf dieselbe Weise wurden pcDNA-ChIL-18 und PBS an je eine weitere Tiergruppe verabreicht.

Das Impfvolumen umfasste je 0,1 ml. Der Impfansatz enthielt je 0,8 mg p30 und 0,25 mg gB (mVLP-gB) und 60 µg des Plasmids pcDNA-ChIL-18.

An LT 7 wurde je eine Blutprobe von den Tieren entnommen. Darüber hinaus folgten im Anschluss an die Wiederholungsimpfung Blutabnahmen an den Tagen 18, 21, 24, 28, 32 und 36 zur Bestimmung der zellulären Immunreaktion und zur Detektion von ChIL-18.

An LT 35 wurden alle Tiere euthanasiert und Organe zur Bestimmung der zellulären Immunantwort, sowie zur Detektion von ChIL-18 und Blutproben zur Bestimmung der humoralen Immunreaktion entnommen.

3.14.4 Probennahme

3.14.4.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte an der Vena ulnaris mit einer 22 G-Kanüle (Braun). Die Menge war jeweils an das Körpergewicht der Tiere angepasst und überstieg nie 1 % des Körpergewichts.

Zur Abscheidung des Serums wurden die Blutproben für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, das Serum anschließend in Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Der koagulierte Anteil der Blutprobe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Für durchflusszytometrische Experimente wurde das Blut mit einer Lösung des Antikoagulans Tri-Natriumcitrat versetzt (Probengefäß 9NC, Sarstedt). Um das Gerinnen des Hühnerblutes zu vermeiden, wurde vom handelsüblichen Mischungsverhältnis (1:10) zwischen Tri-Natriumcitrat und Blut auf ein Verhältnis von 1:5 erhöht und die Probengefäße stets unmittelbar nach der Blutentnahme vorsichtig mehrmals invertiert, sodass die Durchmischung mit Antikoagulans sichergestellt war. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Blutproben bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.14.4.2 Gewichtsbestimmung

Die Gewichtsbestimmung der Tiere erfolgte zweimal wöchentlich mit einer handelsüblichen Küchenwaage (ok. Kitchen Scale, Ingolstadt).

3.14.4.3 Gewinnung von Organen

Die Tiere wurden mit CO₂ betäubt und durch Blutentzug getötet. Milz, Thymus, M. iliobialis dexter und sinister, Leber, Bursa fabricii, Pankreas, Herz, Lunge, Niere, Caecalfollikel und Blutproben wurden unter Verwendung von sterilem Besteck entnommen und zur weiteren Analyse in geeignete Probengefäße überführt; die zur Bestimmung der zellulären Immunantwort vorgesehenen Organe (Milz, Thymus) wurden mit geeignetem Medium (ELISpot-Isolationsmedium) überschichtet und unverzüglich weiterverarbeitet.

Die Organe, welche zum Nachweis der Genexpression dienten, wurden bis zur weiteren Präparation bei - 80 °C gelagert.

3.15 Bestimmung der Immunantwort

3.15.1 Bestimmung der humoralen Immunreaktion

3.15.1.1.1 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) zur Detektion von Antikörpern gegen die Oberflächen-glykoproteine gB, gC und gD

Der Begriff „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) bezeichnet eine antikörpervermittelte Nachweismethode, bei der das gesuchte Antigen mittels enzymatisch katalysierter Farbreaktion nachgewiesen wird.

Zum Nachweis von Antikörpern gegen ILTV-Oberflächenglykoproteine wurde das Poultry Immunoassays Infectious Laryngotracheitis Antibody Test Kit von BioChek verwendet.

Hierbei sind die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit vollständigem, inaktiviertem ILT-Virus beschichtet. Nach Hinzugabe der zu testenden Substanz in einem Volumen von 100 µl, binden darin enthaltene Anti-ILT-Antikörper an die immobilisierten ILT-Viren. Wird anschließend mit dem Enzym Alkalische Phosphatase markiertes Anti-Huhn-IgG zugegeben, kann dieses an die ILT-Antikörper binden. Die Farbentwicklung resultiert aus dem anschließenden Zusetzen des Substrats pNPP-Chromogen.

Bei der Versuchsdurchführung wurde strikt nach den Anweisungen des Herstellers verfahren.

Die Extinktion der Proben und Kontrollen wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm im Multiskan Ex (Thermo Electron Corporation) gemessen.

Die Interpretation der Ergebnisse basierte auf der folgenden Formel:

$$\frac{\text{Mittelwert der Probe} - \text{Mittelwert der Negativkontrolle}}{\text{Mittelwert der Positivkontrolle} - \text{Mittelwert der Negativkontrolle}} = P/PK$$

Woraus sich unter Zuhilfenahme der folgenden Berechnung der Antikörpertiter ermitteln ließ:

$$\text{Log}_{10}(\text{Titer}) = 1,1 \times \text{Log}(P/PK) + 3,361$$

Proben mit einem P/PK-Wert von $\geq 0,5$ wurden dabei als „positiv“ bewertet.

3.15.1.2 ELISA zur Detektion von Antikörpern gegen das Nicht-Strukturglykoprotein gG

Waschpuffer

NaCl (0,5 M)
in PBS, pH 7,2
0,05 % Tween 20

Blockierungspuffer

1 % BSA
TBST

Verdünnungspuffer

Waschpuffer
1 % BSA

TMB-Stoppuffer

HCl (12 M)

Vorbereitend wurden die Vertiefungen der 96-Loch-Mikrotiterplatten mit je 100 µl Glykoprotein G verdünnt in CB-Puffer (8 µg/µl) beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde der Überstand verworfen und jede Vertiefung dreimal mit Waschpuffer gespült. Anschließend wurde mit je 100 µl Blockierungspuffer für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Verwerfen des Überstandes, wurden je 100 µl der zu testenden Seren

in einer Verdünnung von 1:100 in Verdünnungspuffer in Duplikaten aufgetragen. Es folgte eine Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und jede Vertiefung je viermal mit Waschpuffer gespült. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit je 100 µl eines Peroxidase-markierten Maus-anti-Hühner-IgY-Antikörpers in einer Verdünnung von 1:5000 in Verdünnungspuffer. Nach dreimaligem Spülen mit Waschpuffer wurden zur Detektion je 100 µl TMB-Reagenz pro Vertiefung hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 100 µl Stopppuffer beendet und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm erfasst.

3.15.2 Bestimmung der zellulären Immunreaktion

3.15.2.1 Quantifizierung der T-Lymphozyten aus Organproben

Isolationsmedium

98 % RPMI 1640
2 % FCS

Kultivierungsmedium

RPMI 1640
10 % FCS
50 µM 2-Mercaptoethanol (55 mM)
100 U/ml Penicillin-Streptomycin

Blockierungspuffer

RPMI 1640
2 % FCS
50 µM 2-Mercaptoethanol
100 U/ml Penicillin-Streptomycin

Beschichtungspuffer

NaHCO₃ (50 mM)
pH 9,6

Waschlösung

PBS
0,1 % Tween-20

Testpuffer

PBS
0,1 % Tween-20
1 % BSA

3.15.2.1.1 Isolierung von Lymphozyten

Zur Isolierung der Lymphozytenfraktion aus Milz- und Thymusproben wurden die Organe mechanisch zerkleinert und durch Passage durch einen 40 µm-Zellfilter (Sterile Cell Strainer, 40 µm Nylon Mesh, Fisher Scientific) homogenisiert. Die so vereinzelter Zellen wurden in Zentrifugationsröhrchen über die bereits vorgelegte Ficollphase geschichtet. Nach Zentrifugation bei 600 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur und aufgehobener Bremsfunktion konnte die als weißliche Interphase erscheinende Leukozytensuspension abgenommen und in ein neues Gefäß überführt werden, in welchem sie durch Resuspension in PBS, anschließender Zentrifugation bei 400 x g über 10 Minuten bei 20 °C und unter Verwerfen des entstehenden Überstandes weiter aufgereinigt wurden. Im Anschluss wurde die Zelldichte der in PBS resuspendierten Lymphozyten unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (C-Chip Neubauer Improved, Digital Bio) bestimmt und bis zu einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/100 µl mit Kultivierungsmedium verdünnt.

3.15.2.1.2 ELISpot-Assay

Der „Enzyme-linked Immuno Spot Assay“ (ELISpot-Assay) erlaubt den Nachweis sezernierter Zytokine, welche von Immunzellen - nach Stimulation - ausgeschüttet werden. Da die sezernierten Moleküle auf einer Membran immobilisiert werden, lassen sie sich der jeweils einzelnen Zelle, von der sie synthetisiert wurden, zuordnen.

Vorbereitend wurden die Membranen der Vertiefungen einer speziellen ELISpot 96-Loch-Platte (MAIPS4510 Multiscreen®-IP-96-well plates, Merck Milipore) mit je 50 µl Ethanol (35 %) für eine Minute benetzt und je einmal mit Wasser, PBS und Beschichtungspuffer gewaschen. Im Anschluss wurden jeder Vertiefung je 100 µl ChINF-γ-Antikörperlösung (4 µg/ml) beigegeben, sodass diese über Nacht bei 4 °C an den Boden der Vertiefungen binden konnte. Am folgenden Tag wurde die verbliebene Antikörperlösung entfernt, die Platte zweimal mit Blockierungspuffer gewaschen und anschließend für eine Stunde bei 38 °C mit Blockierungspuffer inkubiert. Nach Entfernen des Puffers wurden in jedes Loch 5×10^4 der zu testenden Zellen in je 100 µl Kultivierungsmedium gegeben.

Der Ansatz jeder Zellmischung erfolgte in 8-facher Wiederholung, von denen jeweils ein Duplikat zur Stimulation der Interferon-γ-Produktion mit aufgereinigtem Glykoprotein oder ILT-Virus versetzt wurde. Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit Ionomycin (2 µg/ml)

und PMA (0,4 µg/ml) und die zwei Vertiefungen der Negativkontrolle verblieben ohne weitere Reagenzien. Nach einer 48-stündigen Inkubation bei 38 °C in 5 %-iger CO₂-Atmosphäre wurden die Vertiefungen zweimal mit Wasser und dreimal mit Waschlösung gewaschen. Die Inkubation mit je 50 µl biotinyliertem Maus-anti-ChINF-γ-Primärantikörper (1:310 in Testpuffer) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen mit Waschlösung folgte eine einstündige Inkubation mit 100 µl Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (1:1000 in Testpuffer) bei Raumtemperatur und anschließend fünfmaliges Waschen mit PBS. Zur Detektion wurden je Vertiefung 100 µl Novex[®] Chromogenic Substrate zugegeben und bis zum Farbumschlag für 20 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Platte intensiv unter fließendem Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Platten wurden in einem AID ELISpot reader (AID Autoimmun Diagnostika GmbH) analysiert.

3.15.2.1.3 Bestimmung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten-Subpopulationen

FACS-Puffer

2 % FBS
0,05 % NaN₃
PBS

FACS-Fixationsreagenz

1 % Paraformaldehyd
PBS

3.15.2.1.3.1 Diskontinuierliche Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMC

Zur Isolierung der Fraktion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) aus Natriumcitrat-Blutproben wurde die Blutprobe (500-600 µl) im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und in einem geeigneten Zentrifugationsröhrchen über die bereits vorgelegte Ficollphase (2000 µl) geschichtet. Nach Zentrifugation bei 400 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur und aufgehobener Bremsfunktion konnte die als weißliche Interphase erscheinende Leukozytensuspension abgenommen werden. Diese wurde in ein neues Gefäß überführt, in welchem sie durch Resuspension in PBS und anschließende Zentrifugation bei 400 x g für 5 Minuten bei 4 °C weiter aufgereinigt wurde. Im Anschluss wurde die Zelldichte der in FACS-Puffer resuspendierten PBMC durch Anfärben mit

Trypanblau unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer (C-Chip Neubauer Improved, Digital Bio) bestimmt und durch Hinzufügen von FACS-Puffer auf Aliquots mit einer Konzentration von je 5×10^5 Zellen/50 μl verteilt.

3.15.2.1.3.2 Markierung der Lymphozytensubpopulationen

Die optimale Antikörperkonzentration zur Markierung der Lymphozyten aus Hühnerblutproben wurde per Titration von Verdünnungen zwischen 1 mg/ml und 0,0125 $\mu\text{l}/\text{ml}$ des jeweiligen Antikörpers pro Aliquot und anschließender, durchflusszytometrischer Messung bestimmt. Die Auswertung erfolgte anhand der Berechnung des „*Stain Index*“ (SI) nach der Methode von Telford *et al.* (2012) unter Zuhilfenahme der folgenden Formel:

$$\frac{Med(pos) - Med(neg)}{(84\%(neg) - Med(neg))/0.995} = SI$$

Hieraus resultierten die folgenden Konzentrationen:

Tabelle 3-13 Konzentrationen der Antikörper zur Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen aus Blut mittels FACS.

| Antikörper | Konzentration | Fluorochrom | verwendete Konzentration | Menge / 5×10^5 Zellen |
|------------------------|---------------|-------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|
| CD3⁺ | 0,5 mg/ ml | FITC | 0,25 μg / 5×10^5 Zellen | 0,5 μl |
| CD4⁺ | 0,1 mg/ ml | PE | 0,01 μg / 5×10^5 Zellen | 1 μl (1:10) |
| CD8⁺ | 0,1 mg/ml | PE | 0,025 μg / 5×10^5 Zellen | 2,5 μl (1:10) |

Zur Quantifizierung der Lymphozytensubpopulationen wurden je eine ungefärbte Probe und die beiden Doppelfärbungen CD3⁺/CD4⁺ und CD3⁺/CD8⁺ gemessen. Dazu wurden PMBC enthaltende Aliquots zu je 50 μl mit der tabellarisch aufgeführten Menge Antikörper versetzt und bei 4 °C über 45 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden drei Zentrifugationsschritte bei 400 x g über je 5 Minuten bei 4 °C durchgeführt, zwischen denen das Zellpellet je wie folgt behandelt wurde: Resuspension in 400 μl FACS-Puffer,

Resuspension und Fixierung durch Zugabe von 100 µl FACS-Fixationsreagenz und abschließend erneute Resuspension des Pellets in 250 µl FACS-Puffer. Um eventuell vorliegende Zelltrauben wieder zu vereinzeln, wurden die Proben abschließend durch den 35 µm-Zellfilter der Polystyrol-Rundbodenröhrchen (BD Falcon tube with Cell Strainer Cap) pipettiert. Bis zur weiteren Charakterisierung der enthaltenen Lymphozyten innerhalb eines Zeitraumes von maximal 24 Stunden wurden die Proben bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

3.15.2.1.3.3 Fluorescence-activated cell scanning (FACS)

Die Fluoreszenz basierte Durchflusszytometrie stellt ein Messverfahren dar, das die Analyse von Zellen erlaubt, welche mit hoher Geschwindigkeit einen Laserstrahl passieren. Anhand ihrer Form, Struktur, Größe und Fluoreszenzmarkierung können Eigenschaften der einzelnen Zelle abgeleitet werden.

Die Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen fand unter Verwendung des FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose) der Flow Cytometry Facility der Universität Zürich statt.

Es wurden die folgenden Geräteeinstellungen verwendet:

Spannung:

| | |
|----------------------|-------|
| Forward Scatter FSC | 390 V |
| Sideward Scatter SSC | 489 V |
| FITC | 465 V |
| PE | 338 V |

Es wurden je 5000 Zellen der markierten Populationen gemessen, was etwa 10000 Gesamtzellen entsprach. Als Durchflussgeschwindigkeit wurde hierfür je „medium“ gewählt.

Die Kompensation sich überlagernder Fluoreszenzspektren erfolgte anhand von einzelgefärbten Hühnerblutproben unter Zuhilfenahme der „BD FACSDIVATM“ Software (BD, Biosciences, San Jose).

Die erhaltenen Messdaten wurden mittels des Computerprogramms „FlowJo“, LLC bearbeitet und ausgewertet. Die statistische Auswertung der Daten aus FlowJo erfolgte nach Export in MS Excel.

4 ERGEBNISSE

4.1 Herstellung der Impfstoffkomponenten

4.1.1 Herstellung der VLPs

4.1.1.1 Vermehrung von Plasmid durch Transformation in kompetenten *E.coli*

Die in den Bakterien amplifzierten und anschließend isolierten Plasmide wurden durch enzymatische Restriktion und folgende Auftrennung der Fragmente per Elektrophorese verifiziert. Es zeigten sich die folgenden Restriktionsmuster:

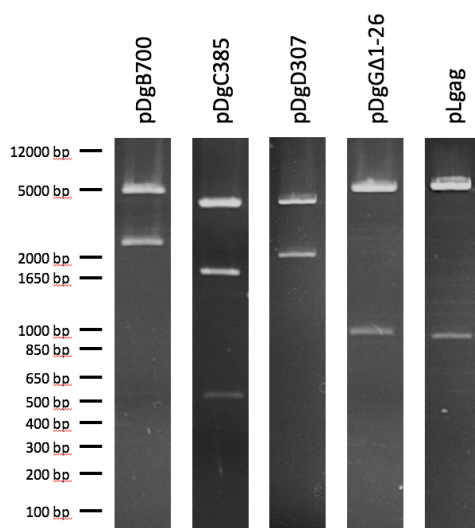


Abb. 4-1 Restriktionsmuster der enzymatisch verdauten Plasmide.

Codierend für die ILTV-Glykoproteine (pDgB700, pDgC385, pDgD307, pDgGA1-26) und das Kapsidprotein des MMLV (pLgag). Die Fragmente wurden in einem 1 %-igen Agarosegel unter Zusatz von Ethidiumbromid aufgetrennt und ihre Verteilung unter UV-Licht visualisiert.

Tabelle 4-1 Restriktionsendonukleasen und resultierende Fragmentgrößen der Plasmide.

Codierend für die ILTV-Glykoproteine (pDgB700, pDgC385, pDgD307, pDgGA1-26) und das Kapsidprotein des murinen Leukämievirus (pLgag).

| | pDgB700 | pDgC385 | pDgD307 | pDgG Δ1-26 | pLgag |
|----------------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Restriktions- endonukleasen | EcoRI NotI | SspI | ScaI | XhoI | XhoI |
| Fragmentgröße | 4980 bp 2470 bp | 4159 bp 1781 bp 553 bp | 4179 bp 2086 bp | 5145 bp 994 bp | 6782 bp 975 bp |

Jedes der Restriktionsmuster konnte durch die Elektrophorese bestätigt werden. Zur weiteren Produktion von VLPs wurden nur Plasmide verwendet, welche keine abweichenden oder zusätzlichen Banden aufwiesen.

4.1.2 Expression der pseudotypisierten VLPs

4.1.2.1 Beurteilung der morphologischen Integrität der VLPs

Nach Expression und Aufreinigung der VLPs erfolgte eine visuelle Überprüfung ihrer morphologischen Integrität mittels Elektronenmikroskopie. Hierbei wurden die ILTV-Glykoproteine auf der Oberfläche der Partikel durch eine Immunogoldfärbung nachgewiesen.

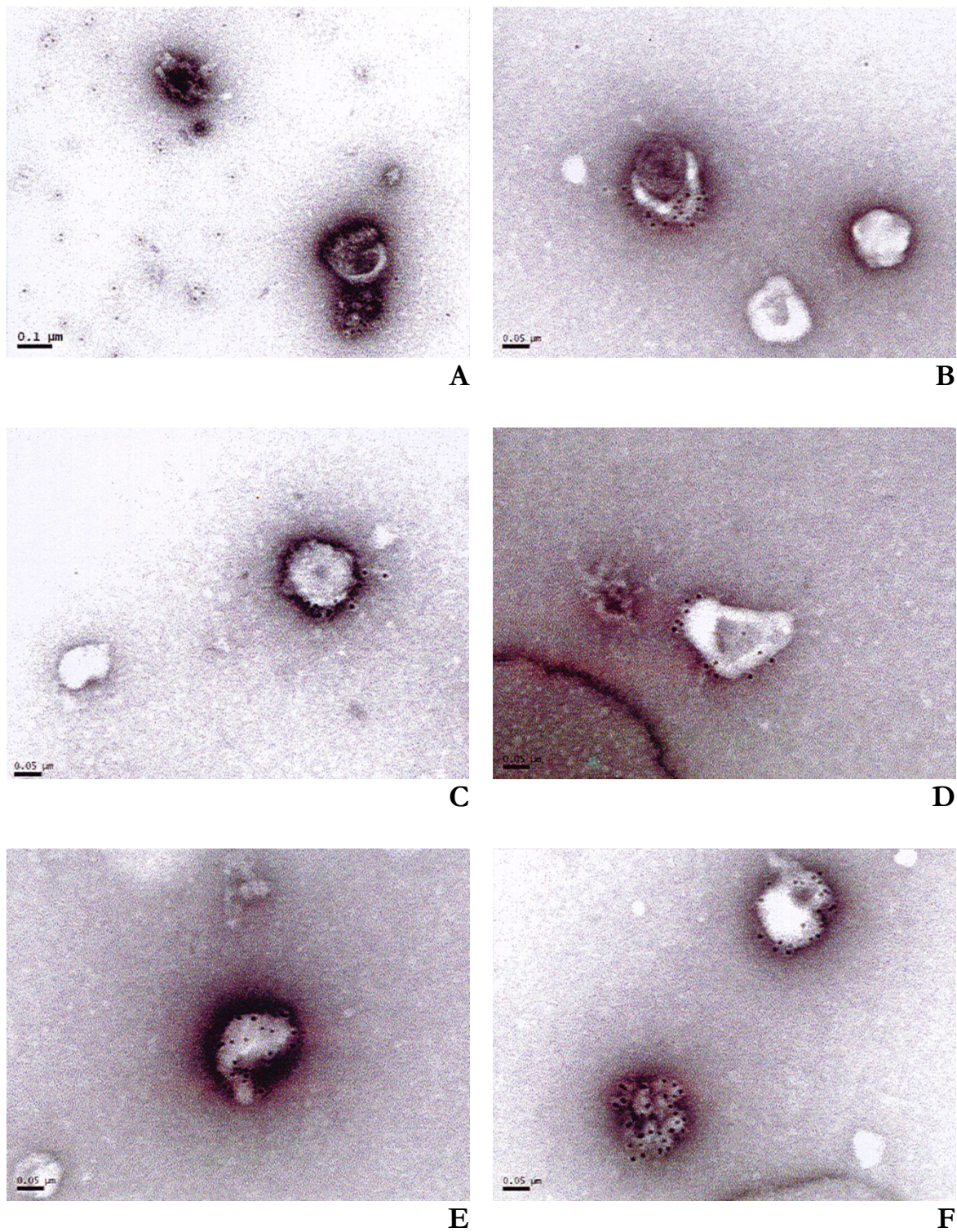


Abb. 4-2 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der VLPs.

Vergrößerung: 85 000x bis 250 000x. Detektion der Oberflächenglykoproteine durch Markierung mittels α -myc-Antikörpers. Die Goldkonjugate des Sekundärantikörpers erscheinen im Bild als schwarze Punkte. **A:** VLP, keine Expression von Glykoprotein. **B-C:** VLP-gC. **D-F:** VLP-gD.

4.1.2.2 Detektion der VLPs mittels Western Blot

Die Western-Blot-Analyse bestätigte die erfolgreiche Expression und Aufreinigung der VLPs. Die vier Oberflächenglykoproteine wurden durch Verwendung eines α -HA-Antikörpers nachgewiesen. Das allen VLPs gemeinsame MLV-*gag*-Protein wurde durch einen α -p30-Antikörper detektiert.

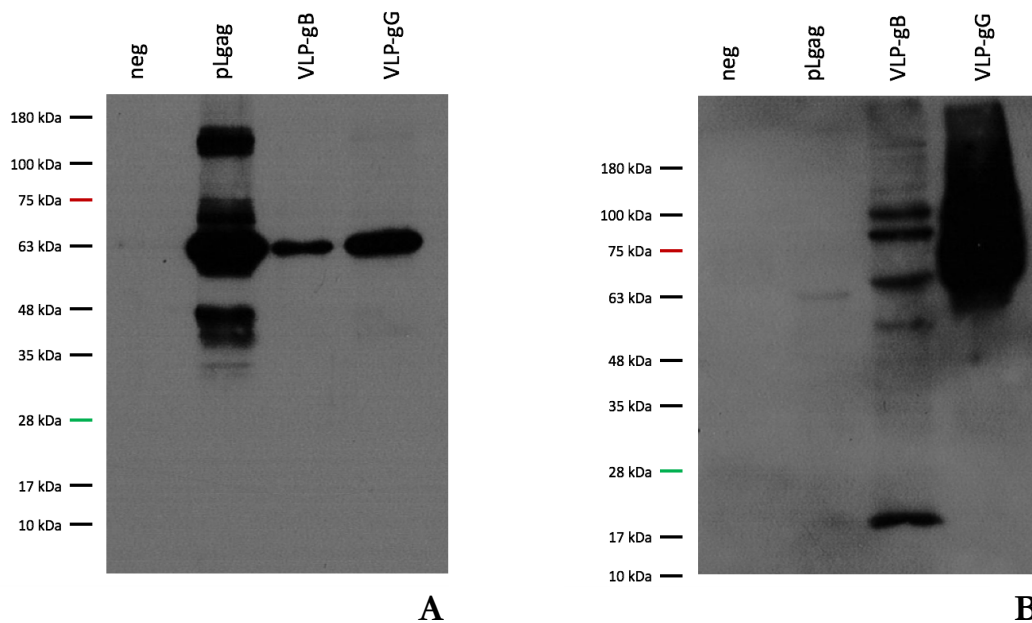


Abb. 4-3 Analyse der VLP-Produktion mittels Western Blot.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 8 %-igem SDS-Gel. **A:** Detektion von MLV-*gag* (α -p30). **B:** Detektion der ILTV-Glykoproteine (α -HA).

Die Banden für die mit einem HA-Tag versehenen ILTV-Glykoproteine ließen sich auf folgender Höhe lokalisieren:

VLP-gB bei etwa 90 kDa

VLP-gG bei etwa 60 kDa

VLP-pLgag bei etwa 60 kDa

Ebenso war MLV-*gag* in allen transfizierten Zellüberständen detektierbar.

4.1.2.3 Maleylierung von VLP-gB

Vor ihrer Verabreichung als Impfstoff in Versuch C wurden die das ILTV-Glykoprotein B tragenden VLPs mit Maleylgruppen versehen. Dies sollte zu einer Verstärkung der zellulären Abwehrmechanismen beitragen.

Nach der Maleylierung in basischem Milieu wurden die so entstandenen mVLP-gB durch erneute Ultrazentrifugation aufgereinigt und konzentriert. Anschließend folgte eine Farbreaktion, welche die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 335 nm ermöglichte. Hiermit wurde die Maleylierung überprüft, indem die freien Aminogruppen bestimmt wurden.

Als Kontrolle wurde parallel zu VLP-gB die gleiche Menge BSA maleyliert.

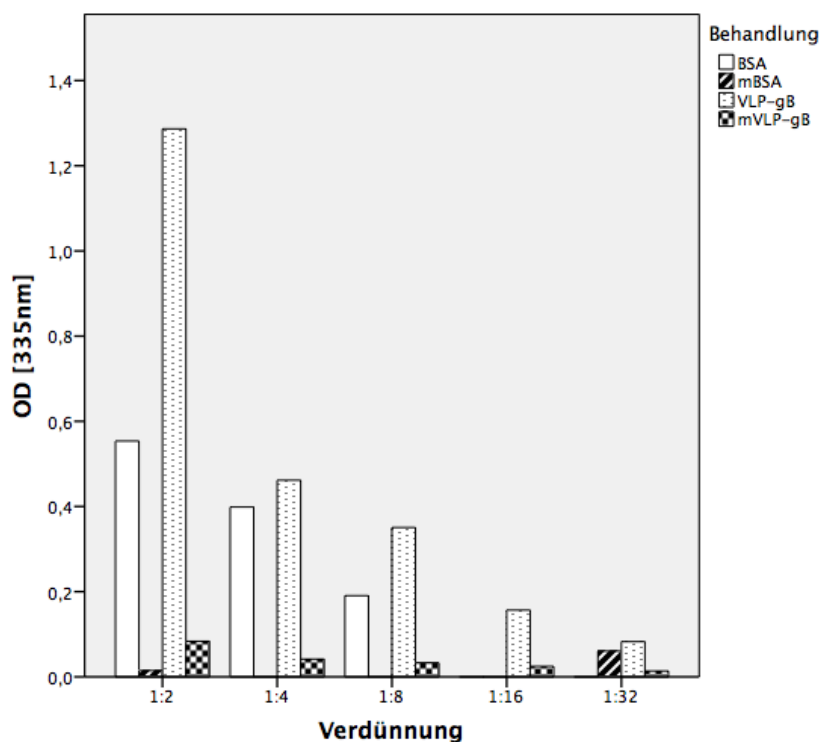


Abb. 4-4 Detektion freier (nicht maleylierter) Aminogruppen.

Unbehandelte (VLP-gB, BSA) und maleylierte (mVLP-gB, mBSA) Proben in absteigender Verdünnung. Messung der optischen Dichte bei 335 nm.

Die Absorption der mVLP-gB wie auch von maleyliertem BSA (mBSA) strebt gegen 0. Die Bestimmung der optischen Dichte von VLP-gB ohne Maleylierung verringert sich von 1,3 in

einer Verdünnung von 1:2 auf den maleylierten Proben vergleichbare Werte in höherer Verdünnung (1:32). Die Detektion freier Aminogruppen in unbehandeltem BSA verläuft ähnlich, beginnend mit einer Absorption von 0,55 (1:2). In Verdünnungen von 1:16 und 1:32 sind keine freien Aminogruppen in den Proben mit BSA mehr detektierbar.

Dies bestätigt das Vorhandensein und die Nachweisbarkeit freier Aminogruppen in gering verdünnten, unbehandelten Proben, wohingegen keine freien Aminogruppen in den je maleylierten Proben mittels der Messung der Absorption bestimmbar sind.

4.1.3 Herstellung der Adjuvantien

4.1.3.1 Klonierung der Expressionsvektoren

Um die immunogene Wirkung der VLPs zu unterstützen, wurden die Zytokine ChIL-2 und ChIL-18 als Adjuvantien gewählt. Da ihre Verabreichung in Form eines DNA-Vakzins vorgesehen war, wurden die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen durch Klonierung in Expressionsplasmide eingefügt. Die Effizienz ihrer Expression wurden zunächst durch *in-vitro*-Versuche bewertet.

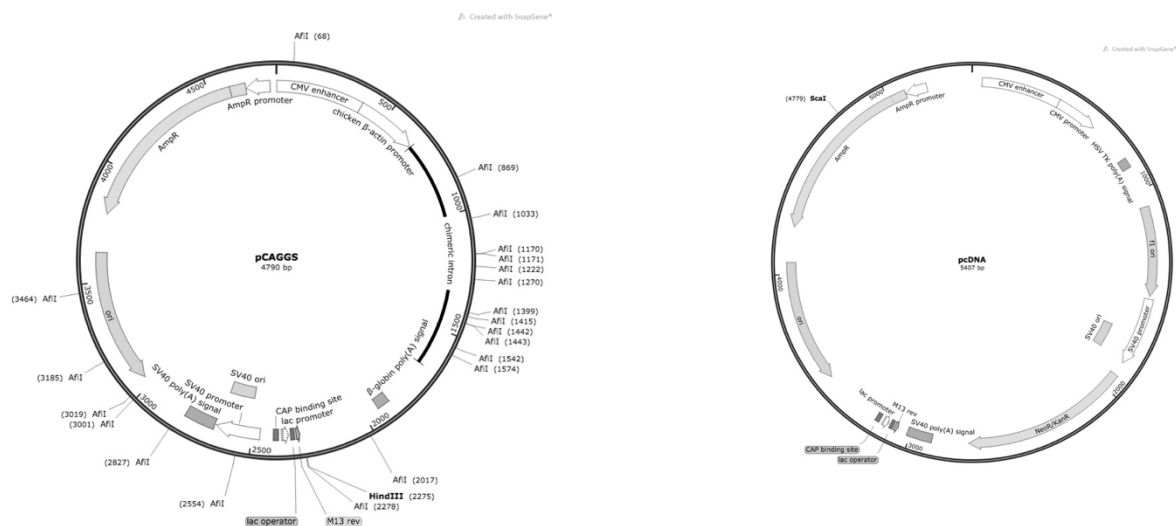


Abb. 4-5 Schematische Darstellung der getesteten Expressionsplasmide für ChIL-2 und ChIL-18.

Basierend auf den Plasmiden pCAGGS (links) und pcDNA3.1 (rechts), unter Angabe der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme, sowie Merkmalen und Funktionen innerhalb der Plasmidsequenz.

4.1.3.2 Amplifikation von ChIL-2 und ChIL-18

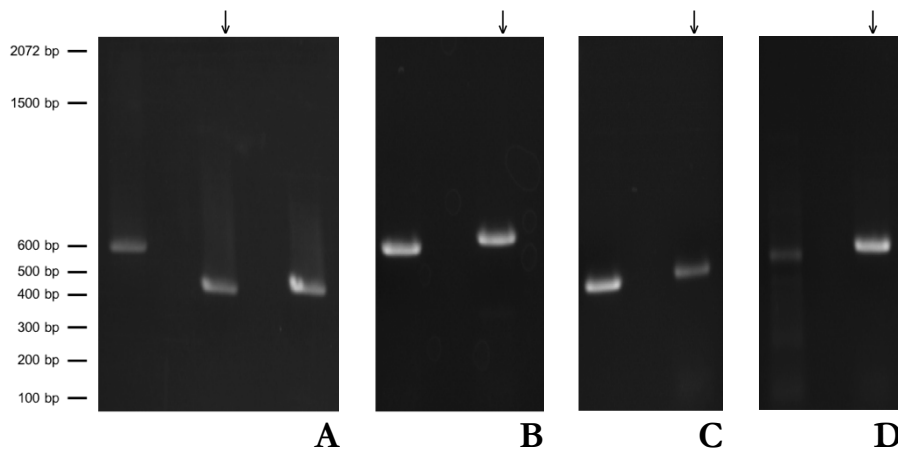


Abb. 4-6 Überprüfung der Größe der PCR-Produkte für ChIL-2 (A, C), ChIL-18 (B, D) durch Auftrennung im elektrischen Feld.

Die Fragmente wurden in einem 1 %-igen Agarosegel mit Zusatz von Ethidiumbromid aufgetrennt und ihre Verteilung unter UV-Licht visualisiert. Die für die weitere Verwendung ausgewählten Produkte sind mittels ↓ markiert.

Es konnten die erwarteten Fragmentgrößen (ChIL-2: 432 bp, ChIL-18: 597 bp) detektiert werden. Zur weiteren Verwendung wurden Proben mit der korrekten Größe aus dem Gel isoliert und in die Expressionsvektoren (pcDNA3.1, pCAGGS) eingefügt.

4.1.3.3 Klonierung von ChIL-2 und ChIL-18 in die jeweiligen Expressionsvektoren

Zur Kontrolle der erhaltenen Plasmide wurden die durch enzymatische Restriktion erhaltenen Fragmente per Elektrophorese aufgetrennt. Konstrukte, welche das richtige Fragmentmuster aufwiesen (in Abb. 4-7 mittels ↓ gekennzeichnet) wurden durch Sequenzierung verifiziert.

Tabelle 4-2 Restriktionsendonukleasen und resultierende Fragmentgrößen der Plasmide.
Codierend für pCAGGS-ChIL-2 und -ChIL-18, sowie für pcDNA-ChIL-2 und -ChIL-18.

| | pCAGGS- ChIL-2 | pCAGGS- ChIL-18 | pcDNA- ChIL-2 | pcDNA- ChIL-18 |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Restriktions- endonukleasen | HindIII EcoR V | AflI HindIII | ScaI-HF | ScaI-HF |
| Fragmentgröße | 4662 bp 579 bp | 4757 bp 667 bp | 4467 bp 1285 bp | 4185 bp 1825 bp |

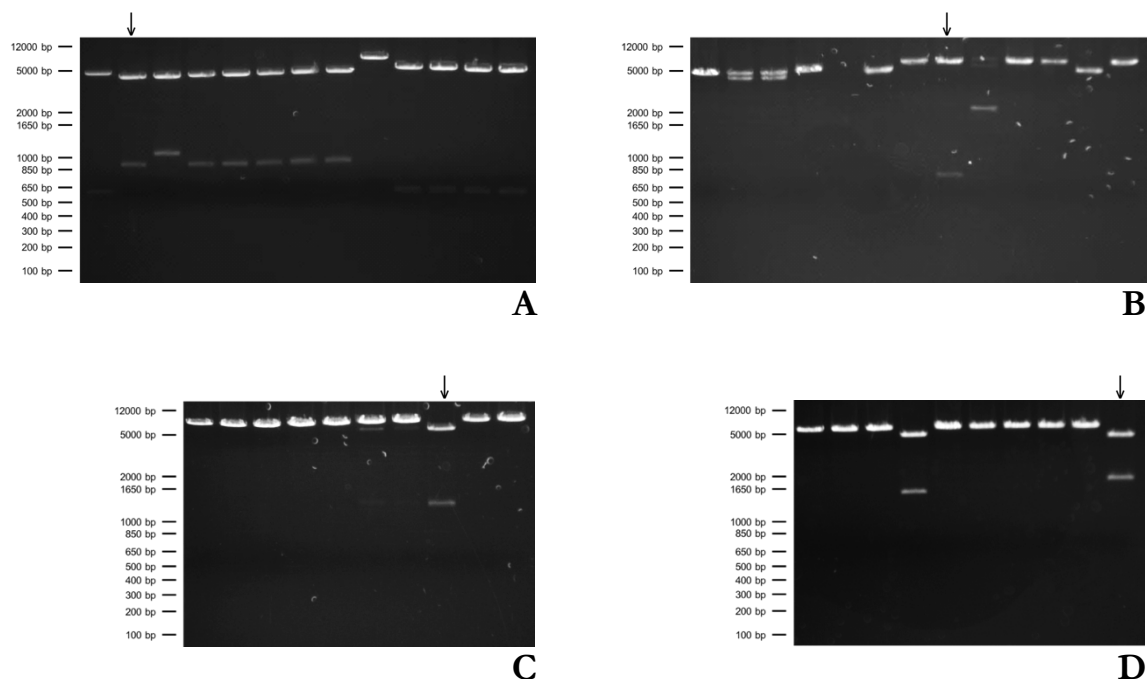


Abb. 4-7 Restriktionsfragmente der Klonierungsprodukte für pCAGGS-ChIL-2 (A), pCAGGS-ChIL-18 (B), pcDNA-ChIL-2 (C) und pcDNA-ChIL-18 (D).

Die Fragmente wurden in einem 1 %-igen Agarosegel mit Zusatz von Ethidiumbromid aufgetrennt und ihre Verteilung unter UV-Licht visualisiert. Die für die weitere Verwendung ausgewählten Produkte sind mittels ↓ markiert.

4.1.4 ChIL-Expression *in vitro*

4.1.4.1 Nachweis von ChIL-2 und ChIL-18 mittels Western Blot

Um ChIL-2 und ChIL-18 in den transfizierten Zellen nachzuweisen, wurden je 10 µg des Zelllysats und je 20 µl der Zellkulturüberstände beider Versuchsansätze mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Zum Nachweis von ChIL-2 wurde ein α -ChIL-2-Antikörper eingesetzt,

ChIL-18 wurde mittels eines α -His-Tag-Antikörpers detektiert.

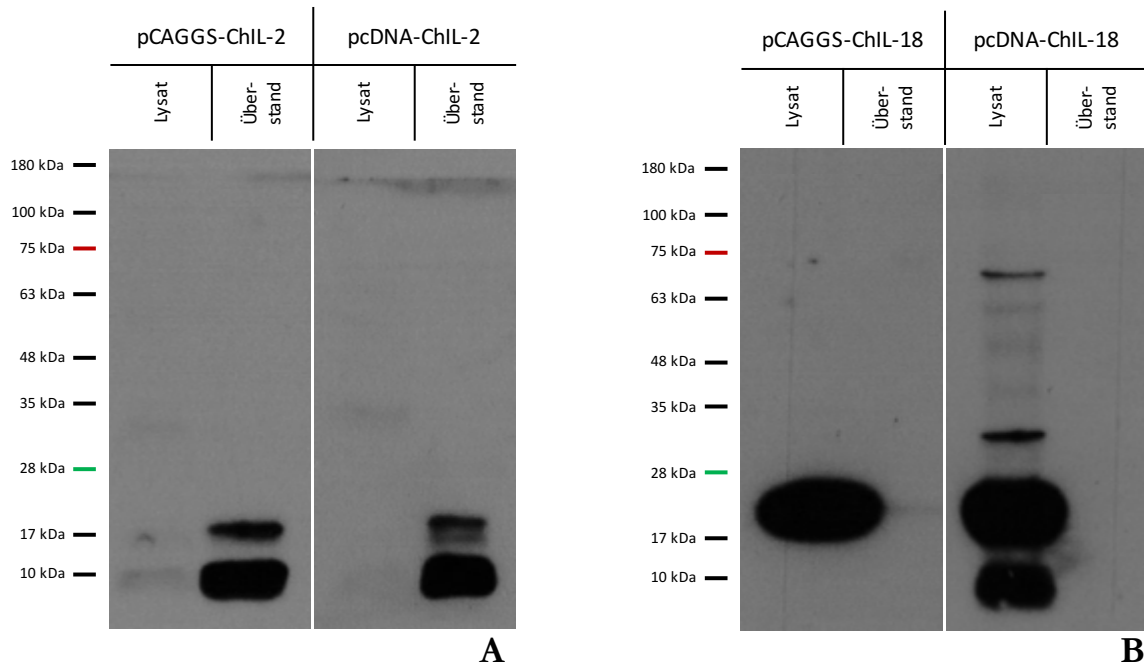


Abb. 4-8 Analyse der Interleukinexpression mittels Western Blot.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in je einem 12 %-igen SDS-Gel. **A:** Detektion von ChIL-2 mittels α -ChIL-2. **B:** Detektion von ChIL-18 mittels α -His.

In beiden ChIL-2-Ansätzen wurden zwei intensive Banden in den Überständen detektiert. Die etwas Stärkere auf einer Höhe von etwa 10 kDa und die Schwächere bei etwa 18 kDa. Im Lysat konnte nur für das Konstrukt pCAGGS-ChIL-2 eine sehr schwache Bande auf Höhe von 10 kDa nachgewiesen werden.

In den Ansätzen für ChIL-18 wurde im Lysat je eine sehr starke Bande auf einer Höhe von etwa 19 kDa nachgewiesen. Eine weitere starke Bande erschien im Lysat des Konstruktes pcDNA-ChIL-18 bei etwa 10 kDa, sowie weitere, schwächere Banden zwischen 30 kDa und 70 kDa.

Zur Überprüfung, ob äquivalente Mengen Proteins eingesetzt wurden, folgte ein weiterer Western Blot mit ChIL-18 und ChIL-2. Dabei wurde ein gegen Aktin gerichteter Antikörper zur Ladekontrolle angewandt.

Hierbei war sowohl in den Lysaten der Ansätze mit ChIL-2 und ChIL-18, als auch im zellulären Anteil der ohne Zusatz transfizierten Probe (Mock) je eine Bande auf einer Höhe von etwa 48 kDa, die jeweils gleich stark war, detektierbar. In den Überständen der transfizierten Zellkulturen ließen sich keine Banden nachweisen.

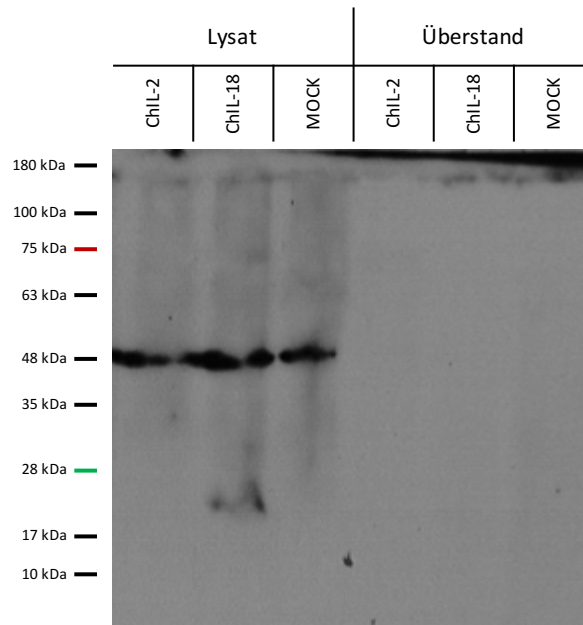


Abb. 4-9 Nachweis von Aktin mittels Western Blot in Zelllysat bzw. Überstand.

Nach Transfektion mit pcDNA-ChIL-2 bzw. -ChIL-18, oder nach alleiniger Zugabe von Transfektionsreagenz (Mock) fand die Auftrennung der exprimierten Proteine in je 12 %-igem SDS-Gel statt, die Probenmenge umfasste je 10 µg der im Lysat bestimmten Proteinmenge bzw. 20 µl der Zellüberstände. Zur Detektion wurde ein α -Aktin-Antikörper verwendet.

4.1.4.2 Nachweis von ChIL-2- und ChIL-18-RNA

Zum Vergleich der beiden Promotoren (modifizierter Hühner- β -Aktin-Promotor in pCAGGS und CMV-Promotor in pcDNA) wurden die mRNA-Konzentrationen in transfizierten Zellen bestimmt, um so gleiche Ausgangsmengen in der sich anschließenden qRT-PCR einsetzen zu können.

Diese erbrachte die folgenden Resultate:

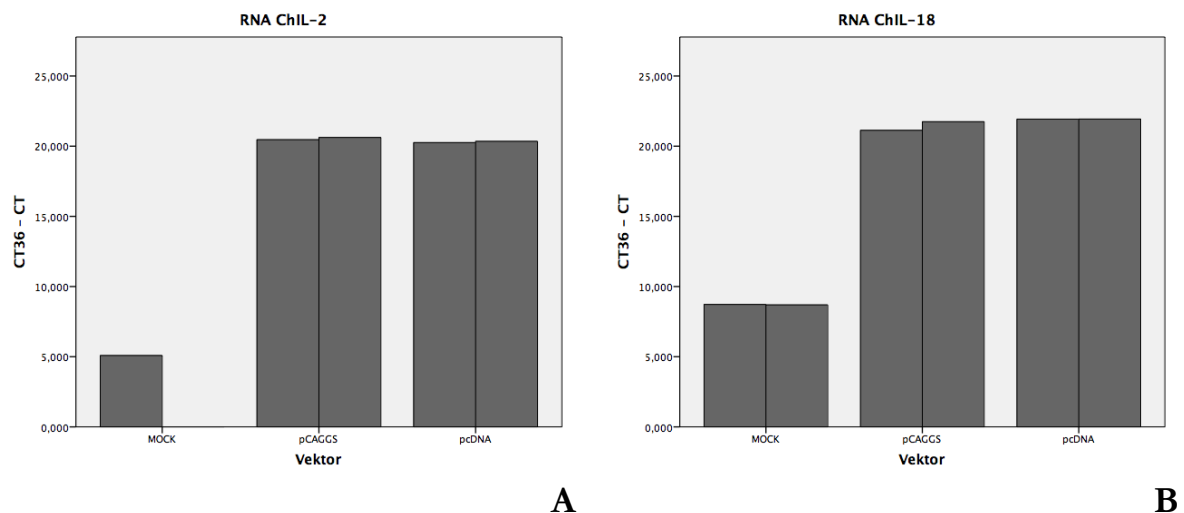


Abb. 4-10 Vergleich der RNA-Konzentration beider Interleukine ChIL-2 und -18 nach Transfektion.

Darstellung der CT-Werte aus qRT-PCR, Ansätze jeweils in Duplikaten à 600 µg. **A:** Nachweis der RNA von ChIL-2. Probe 2, MOCK: nicht detektierbar. **B:** Nachweis der RNA von ChIL-18.

Die Expression der beiden Interleukine war sowohl in pCAGGS wie auch in pcDNA erfolgreich. Es konnten jeweils mRNA für ChIL-2 und auch für ChIL-18 per qRT-PCR nachgewiesen werden, im Mock-Ansatz lagen die CT-Werte bei mindestens 27,28 und damit deutlich höher als in den Proben, denen Plasmid zugesetzt wurde.

Für die Anzahl der RNA-Kopien in jeder der Proben ergaben sich durch Abgleich mit Standardverdünnungen im Mittel die folgenden Werte:

| | |
|---------------|--------------------|
| Mock | 5338,79 |
| pCAGGS-ChIL-2 | $2,02 \times 10^8$ |
| pcDNA-ChIL-2 | $1,71 \times 10^8$ |

| | |
|----------------|--------------------|
| Mock | 33371,72 |
| pCAGGS-ChIL-18 | $1,27 \times 10^8$ |
| pcDNA-ChIL-18 | $1,71 \times 10^8$ |

Der Vergleich der CT-Werte und der Kopienzahl zwischen den beiden Plasmiden erbrachte keine Unterschiede bei der mRNA für ChIL-2 und nur geringfügige Vorteile bei der Verwendung von pcDNA für ChIL-18.

4.1.4.3 Endotoxin-freie Produktion der Adjuvantien pcDNA-ChIL-2 und pcDNA-ChIL-18

Die Präparation der als Adjuvantien *in vivo* verwendeten Plasmide pcDNA-ChIL-2 und pcDNA-ChIL-18 wurde als endotoxinfreie Extraktion durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die aufgereinigten Plasmide auf Endotoxinrückstände untersucht.

Die im Doppelansatz bestimmten Werte von 0,004 und 0,005 EU/ μ g Plasmid (Endotoxin Units, Endotoxineinheiten) lagen unterhalb des Referenzwertes von 0,1 für die Absenz von Endotoxinen.

4.2 Experimentelle Vakzinationen

4.2.1 Quantifizierung der VLPs

4.2.1.1 Aufreinigung der Glykoproteine und Detektion mittels Goldfärbung und Western Blot

Um die Impfstoffdosis der einzelnen VLP-Gruppen definieren zu können, wurde deren Konzentration in Relation zur Menge der exprimierten Glykoproteine bestimmt, da angenommen wurde, dass deren Anzahl auf der Oberfläche der VLPs maßgeblich für die immunogene Wirkung sei.

Zur Quantifizierung der VLPs bzw. der darauf präsentierten Antigene werden als Referenz aufgereinigte ILTV-Glykoproteine verwendet. Diese wurden aus transfizierten LMH-Zellen isoliert und die einzelnen Aufreinigungsschritte durch Anfärbung mit kolloidalem Gold dokumentiert.

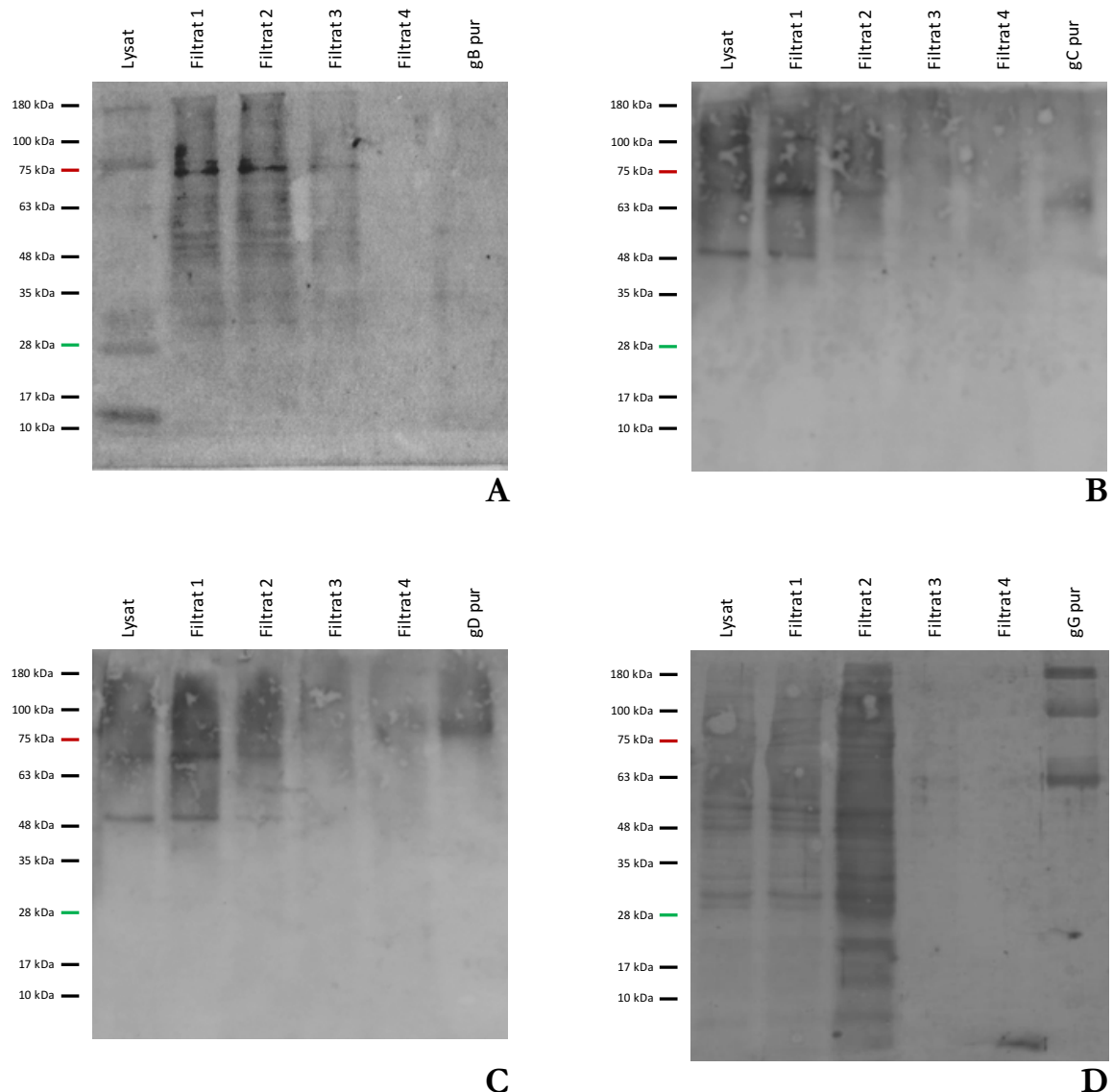


Abb. 4-11 Aufreinigung der Glykoproteine gB, gC, gD und gG (A, B, C, D).

Darstellung der einzelnen Aufreinigungsschritte mit der ungereinigten Zellkultur (Lysat), gefolgt von den Verlaufspröben der einzelnen Aufreinigungsschritte (Filtrat 1-4), sowie dem isolierten Glykoprotein (gX pur). **D:** Aufreinigungsschritte von Glykoprotein G, wobei die Proben „Lysat“ und „Filtrat 1“ aufgrund der hohen Proteindichte im Verhältnis 1:10 verdünnt wurden.

Durch Färbung mit kolloidalem Gold werden alle Proteine im Blot dargestellt. Während also im Lysat zahlreiche Banden, verteilt über die gesamte Länge des Blots detektierbar sind, werden diese im Verlauf der Aufreinigung immer weniger. Letztendlich wird nur noch eine Bande detektiert, welche dem isolierten Protein entspricht. Dies ist besonders deutlich der Fall für die Glykoproteine gC und gD, wohingegen das Endprodukt der Aufreinigung von gG noch drei Banden aufweist, jedoch im Verlauf der Waschschrirte ebenfalls deutlich an Reinheit gewinnt.

Die Banden der einzelnen Glykoproteine lassen sich wie folgt lokalisieren:

| | |
|---------|---------------------------------|
| gB700 | etwa 90 kDa |
| gC385 | etwa 63 kDa |
| gD307 | etwa 78 kDa |
| gGΔ1-26 | etwa 70 kDa, 90 kDa und 185 kDa |

Die Messung der Proteinkonzentration der aufgereinigten Proben durch Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm ergab die folgenden Werte:

| | |
|---------|------------|
| gB700 | 1,86 µg/µl |
| gC385 | 1,59 µg/µl |
| gD307 | 1,57 µg/µl |
| gGΔ1-26 | 1,50 µg/µl |

Für die Glykoproteine gB und gG wurde der Verlauf der Aufreinigung darüber hinaus mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte durch einen α -myc-Antikörper. Es wurden äquivalente Anteile des Gesamteluats eingesetzt.

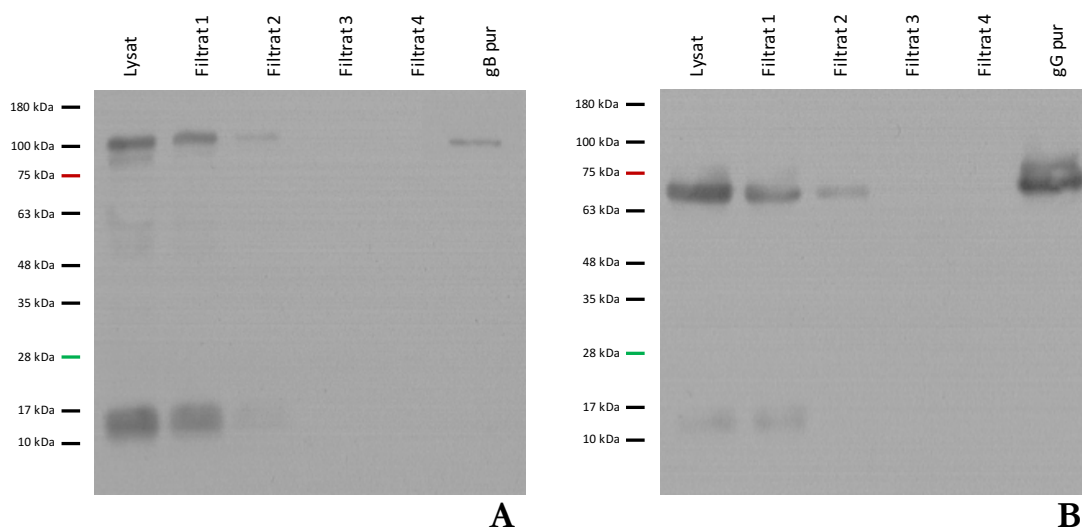
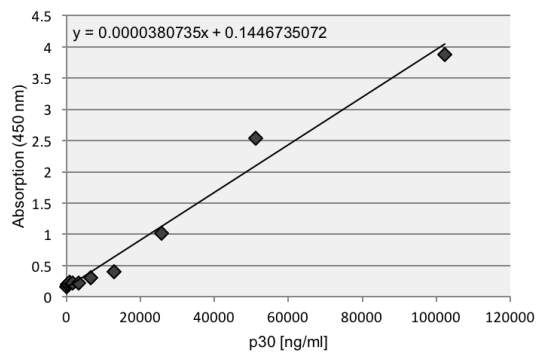


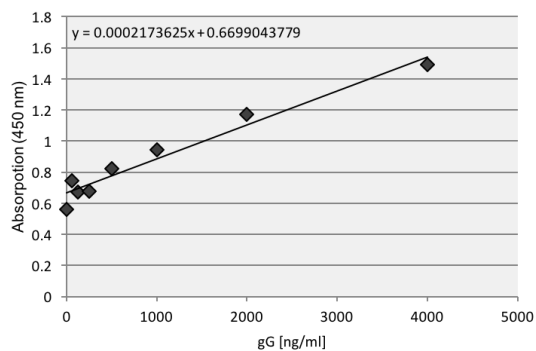
Abb. 4-12 Western Blot der einzelnen Aufreinigungsschritte von Glykoprotein B (A) und Glykoprotein G (B). Mit selektiver Detektion des jeweiligen Glykoproteins durch einen gegen den myc-Tag gerichteten Antikörper. Die Auftrennung fand in einem 10 %-igen SDS-Gel statt.

4.2.1.2 Relative Quantifizierung der VLP-Antigene

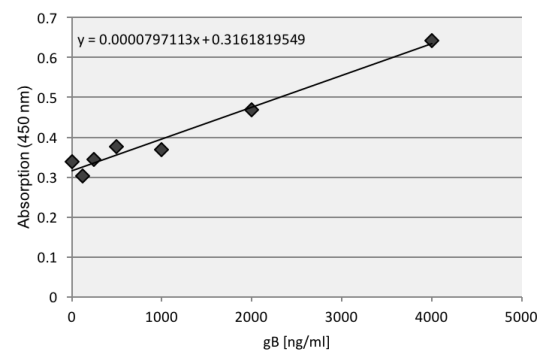
Zur Quantifizierung der VLPs wurde die Konzentration von p30, einem Spaltprodukt des Kapsidproteines *gag*, sowie die Anzahl der auf der VLP-Oberfläche exprimierten Glykoproteine anhand der Detektion ihres myc-Tags mittels ELISA bestimmt.



A



B



C

Abb. 4-13 Relative Quantifizierung der VLPs für Versuch B und C.

Verdünnungskurven der jeweiligen, aufgereinigten Vergleichsproteine. **A:** p30 mittels α -p30. **B:** gG mittels α -myc. **C:** gB mittels α -myc. Die enthaltene Formel dient als Berechnungsgrundlage der Antigenkonzentration der VLPs.

Der Abgleich der Absorption der pseudotypisierten VLPs mit den aufgereinigten Antigenen erbrachte die folgenden Konzentrationen:

Tabelle 4-3 Konzentration von Antigen und Kapsidprotein.

Mittels ELISA bestimmte Konzentrationen Impfstoffe der Versuche A, B und C.

| | | p30 | Glykoprotein |
|------------------|--------|-------------|--------------|
| Versuch A | VLP-gB | 0,8 mg/ml | 0,24 mg/ml |
| | VLP-gC | 0,5 mg/ml | 0,14 mg/ml |
| | VLP-gD | 1,6 mg/ml | 0,49 mg/ml |
| | VLP-gG | 1,6 mg/ml | 0,44 mg/ml |
| Versuch B | VLP-gG | 10,88 mg/ml | 2,95 mg/ml |
| Versuch C | VLP-gB | 8,01 mg/ml | 2,53 mg/ml |

Diese Werte dienten als Grundlage zur Berechnung der in den experimentellen Vakzinationen eingesetzten Impfstoffdosen.

4.2.2 Verträglichkeit des Impfstoffes

4.2.2.1 Effekt der *in-ovo*-Impfung auf die Schlupfrate

Die Schlupfrate bezieht sich auf den Anteil geschlüpfter Küken nach der *in-ovo*-Vakzination an Embryonaltag 18. Die Vitalität der Küken stützt sich auf die Aufzuchttrate der lebensfähigen Küken nach Schlupf.

Die Schlupfrate und die Vitalität der einzelnen Gruppen waren wie folgt:

Tabelle 4-4 Schlupfrate und Vitalität der Küken nach *in-ovo*-Vakzination am 18. Bebrütungstag.

| Impfstoff | Schlupfrate | Vitalität |
|----------------------------------|-------------|-----------|
| PBS^{*1} | 100 % | 100 % |
| VLP | 100 % | 100 % |
| VLP-gB | 100 % | 100 % |
| VLP-gC | 85,7 % | 100 % |
| VLP-gD | 100 % | 100 % |
| VLP-gG | 100 % | 100 % |
| VLP-gG + pcDNA-ChIL-2 | 57,1 % | 100 % |
| pcDNA-ChIL-2 | 42,9 % | 100 % |
| PBS^{*2} | 75 % | 100 % |

^{*1} zu Versuch A, ^{*2} zu Versuch B

4.2.2.2 Effekt der Impfstoffapplikation auf das Allgemeinbefinden

Die Einschätzung des Allgemeinbefindens der Küken orientierte sich an den folgenden Symptomen:

gesträubtes Gefieder

geschlossene Augenlider

verstärkte Atmung

Schnabelatmung

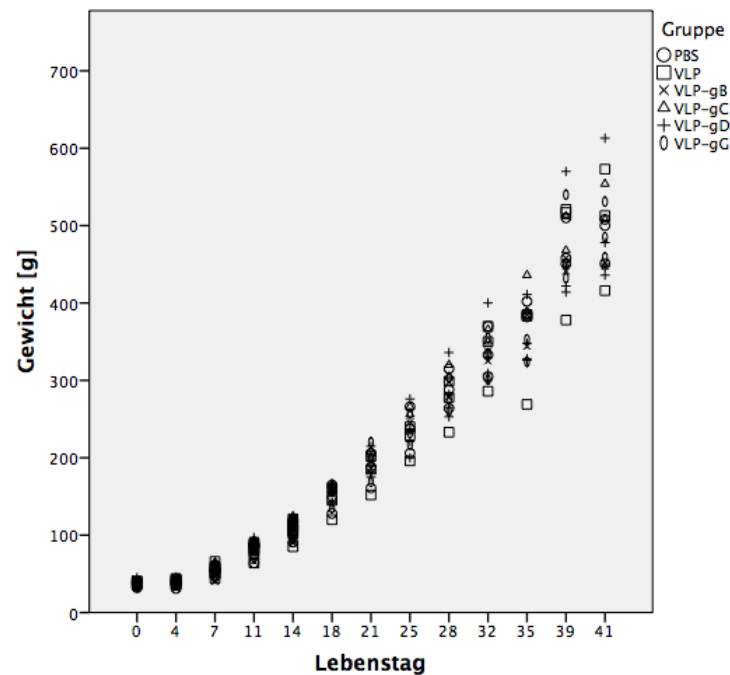
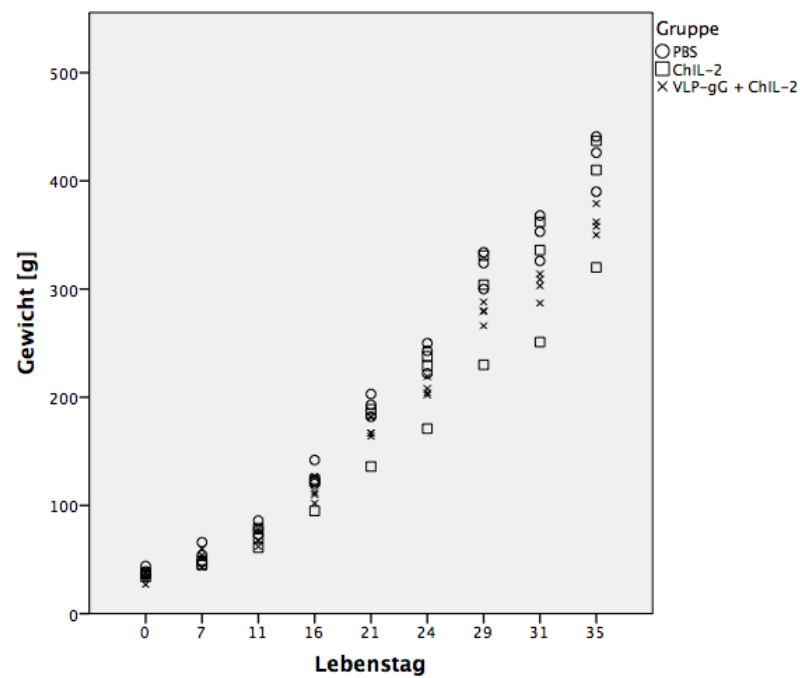
Absonderung von Nasensekret

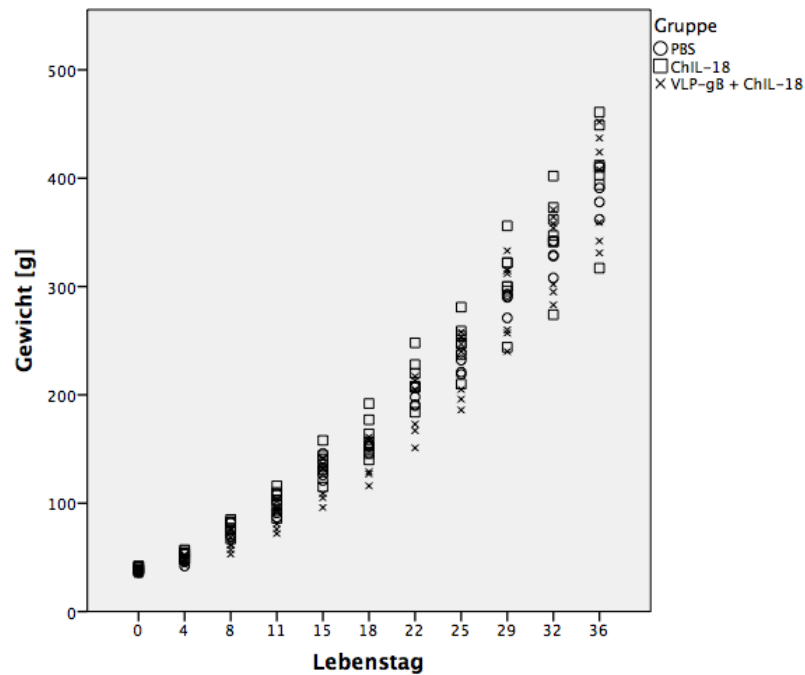
Das Auftreten von mindestens zwei Symptomen war entscheidendes Kriterium für die sofortige Euthanasie. Dieser Fall trat für keines der Versuchstiere ein.

Daneben floss die Beurteilung des Gangbildes, sowie des Auftretens von Lahmheiten und Lähmungen für die Tiere in die Bewertung des Allgemeinbefindens ein, welche eine intramuskuläre Injektion in den M. iliotibialis lateralis dexter am 14. Lebenstag erhielten. Auch hierbei wurden keine Auffälligkeiten festgestellt. Bei der Sektion nach Abschluss der *in-vivo*-Versuche waren an der Injektionsstelle bei keinem der Versuchstiere Läsionen, Entzündungserscheinungen oder andere pathologische Veränderungen im Vergleich mit der kontralateralen Gliedmaße erkennbar.

4.2.2.3 Effekt der Impfstoffapplikation auf die Gewichtsentwicklung

Neben Schlupfrate, Vitalität und Allgemeinbefinden wurde die Gewichtsentwicklung als Kriterium zur Beurteilung der Impfstoffverträglichkeit herangezogen.

**A****B**



C

Abb. 4-14 Gewichtszunahmen der einzelnen Küken, gruppiert nach verabreichtem Impfstoff.

A: Messwerte aus Versuchsansatz A, nach *in-ovo*-Applikation von VLP-gB, -gC, -gD oder gG, sowie VLP oder PBS. **B:** Messwerte aus Versuchsansatz B, nach *in-ovo*-Applikation von VLP-gG + pcDNA-ChIL-2 oder pcDNA-ChIL-2 oder PBS und Wiederholungsimpfung an Lebenstag 14. **C:** Messwerte aus Versuchsansatz C, nach intramuskulärer Applikation von VLP-gB + pcDNA-ChIL-18 oder pcDNA-ChIL-18 oder PBS an Lebenstag 14.

Die Gewichtsentwicklung der Tiere während des Versuchszeitraumes folgt einem annähernd exponentiellen Verlauf. Es sind keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Impfstoffgruppen feststellbar. Vereinzelt, nach oben abweichende Messwerte einzelner Individuen zu späteren Zeitpunkten im Versuch stammen von Tieren männlichen Geschlechts.

4.2.3 Bestimmung der Immunantwort

4.2.3.1 Bestimmung der humoralen Immunreaktion

4.2.3.1.1 ELISA zur Detektion von Antikörpern gegen ILTV-Oberflächenglykoproteine

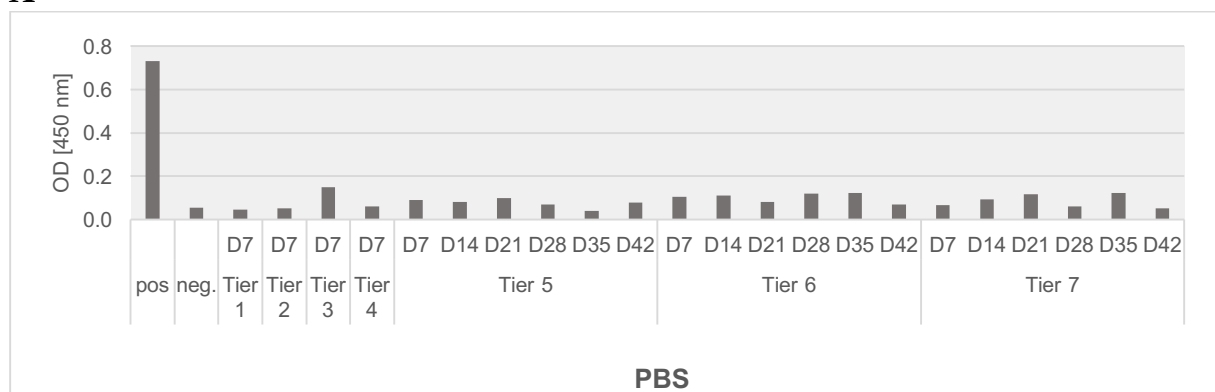
Die Detektion von Antikörpern gegen ILTV-Oberflächenantigene erfolgte im Versuchsansatz A anhand von Blutproben der LT 14, 21, 28, 35 und 42. In Versuchsansatz C wurden Blutproben von LT 36 untersucht. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde der P/PK-Wert berechnet.

Die berechneten Werte aller Proben liegen $\leq 0,5$ und sind daher als „negativ“ zu bewerten. Es konnten somit im Versuch A und in Versuch C keine Antikörper gegen ILTV und insbesondere gegen die im Impfstoff enthaltenen Oberflächenglykoproteine gB, gC und gD detektiert werden. Des Weiteren wurde in der Impfgruppe, die mit VLP-gG immunisiert wurde, kein positives Signal mittels dieser Methode festgestellt. Auch die Applikation von PBS und dem VLP-Grundgerüst generierte keine Antikörperantwort gegen ILTV.

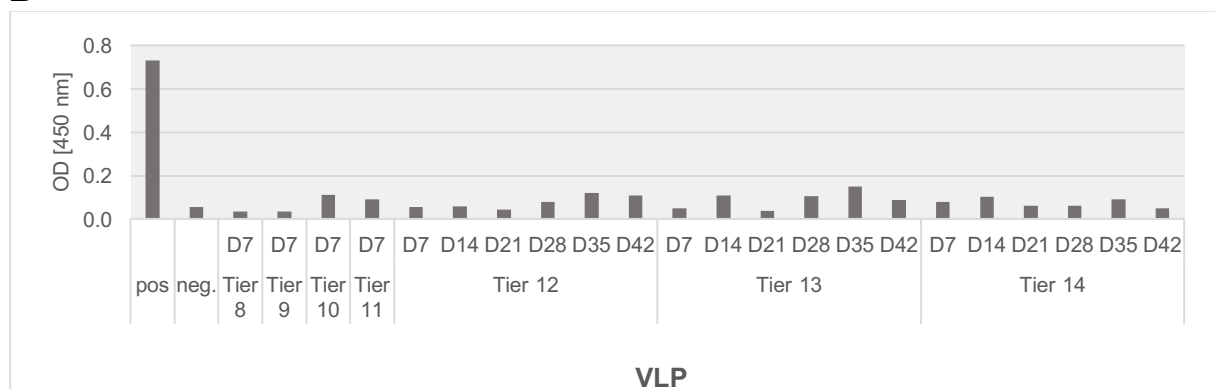
4.2.3.1.2 ELISA zur Detektion von Antikörpern gegen das Nicht-Strukturglykoprotein gG

Der Nachweis von Antikörpern gegen Glykoprotein G in Versuchsansatz A erfolgte anhand von Serumproben von Lebenstag 7 bei allen Tieren, sowie von den Tagen 14, 21, 28, 35 und 42 von der Hälfte der Tiere.

A



B



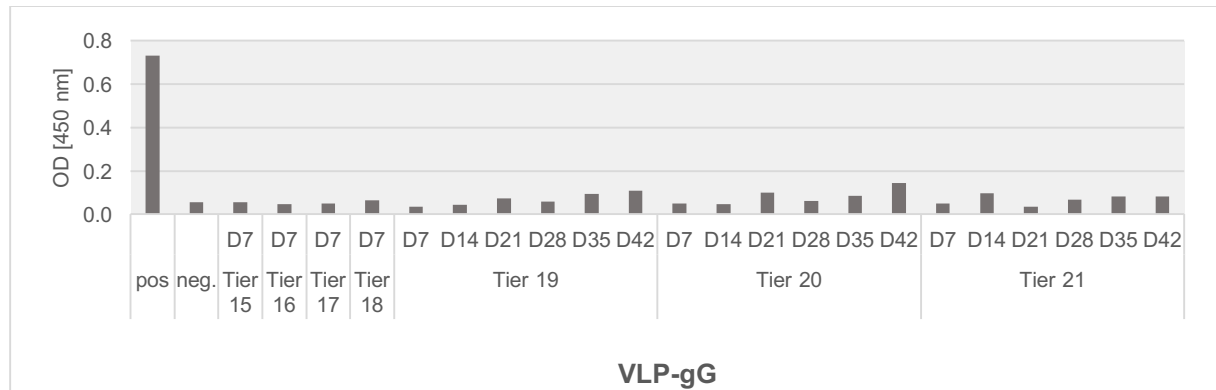
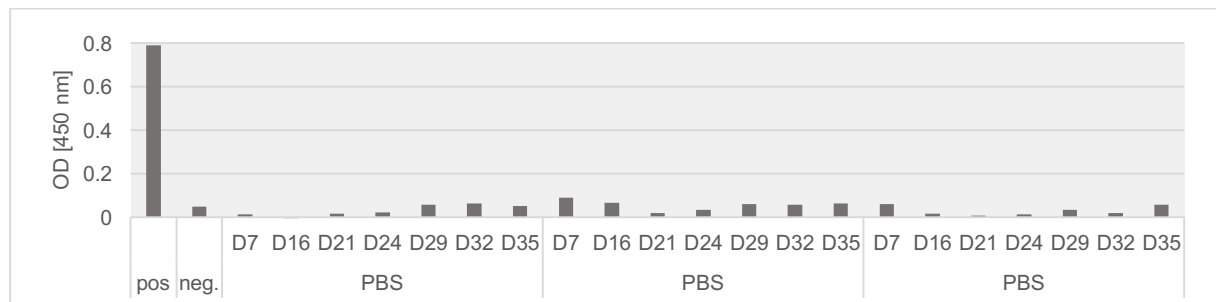
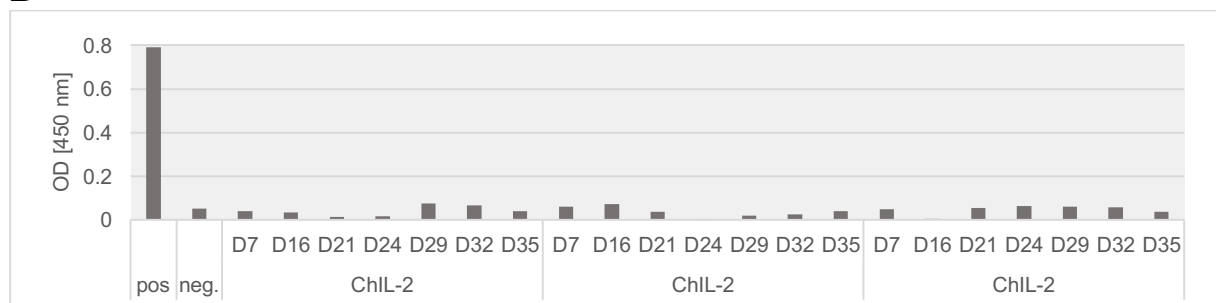
C

Abb. 4-15 Messung der optischen Dichte bei 450 nm zur Detektion von Antikörpern gegen das Nicht-Strukturglykoprotein gG in Versuch A.

Messung anhand des Blutserums der Lebensstage 14, 21, 28, 35 und 42. **A:** 7 Tiere mit PBS-Injektionen. **B:** 7 Tiere, vakziniert mit VLP. **C:** 7 Tiere, vakziniert mit VLP-gG.

In keiner der Gruppen lassen sich Veränderungen der optischen Dichte bei 450 nm feststellen, die auf die Produktion von gegen Glykoprotein G gerichtete Antikörper schließen ließen.

Der Nachweis von Antikörpern gegen Glykoprotein G in Versuchsansatz B erfolgte anhand von Serumproben der Lebensstage 7, 16, 21, 24, 29, 32 und 36.

A**B**

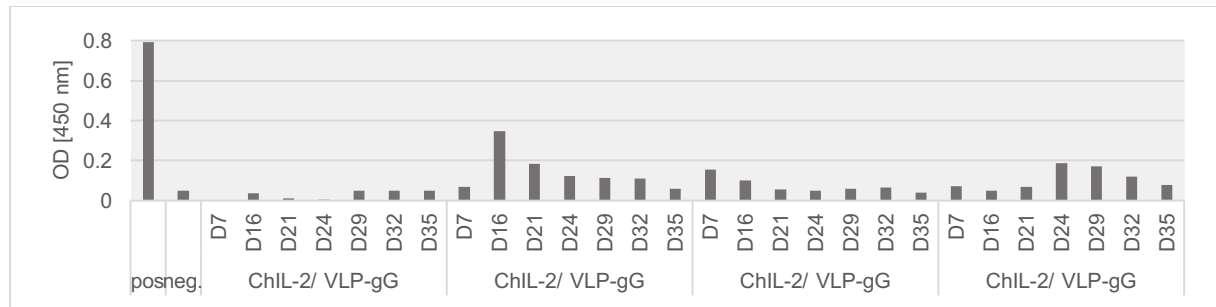
C

Abb. 4-16 Messung der optischen Dichte bei 450 nm zur Detektion von Antikörpern gegen das Nicht-Strukturglykoprotein gG in Versuch B.

Messung anhand des Blutserums der Lebensstage 7, 16, 21, 24, 29, 32 und 36. **A:** 3 Tiere mit PBS-Injektionen. **B:** 3 Tiere, vakziniert mit pcDNA-ChIL-2. **C:** 4 Tiere, vakziniert mit VLP-gG + pcDNA-ChIL-2.

In den beiden Gruppen der mit PBS und pcDNA-ChIL-2 vakzinierten Tiere lassen sich keine Veränderung der optischen Dichte bei 450 nm feststellen. In der Gruppe der Impfungen mit VLP-gG + pcDNA-ChIL-2 sind Veränderungen der optischen Dichte bei drei der vier Tiere detektierbar. Bei einem Tier sind auf diese Weise gegen VLP-gG gerichtete Antikörper bereits zum Zeitpunkt der ersten Messung an Tag 7 detektierbar, bei zwei weiteren steigt die Absorption an LT 16 bzw. 24, also nach der Wiederholungsimpfung an LT 14. Bei allen drei Tieren fallen die Werte im Anschluss bis zu LT 35 wieder ab.

4.2.3.2 Bestimmung der zellulären Immunreaktion

4.2.3.2.1 FACS zur Bestimmung von Subpopulationen der T-Lymphozyten

Zur Bestimmung von Veränderungen der anteiligen Zahlen von $CD3^+$ -, $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Lymphozyten und des $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten in Versuchsansatz C diente die FACS-Analyse. Dazu wurden diese T-Lymphozytensubpopulationen aus Citratblutproben der Lebensstage 12, 18, 22, 25, 29, 32 und 36 isoliert und quantifiziert.

Mittels der vorangehenden Titration der Fluoreszenz-Antikörper und der Berechnung des Stain Index wurden die optimalen Antikörperkonzentrationen ermittelt.

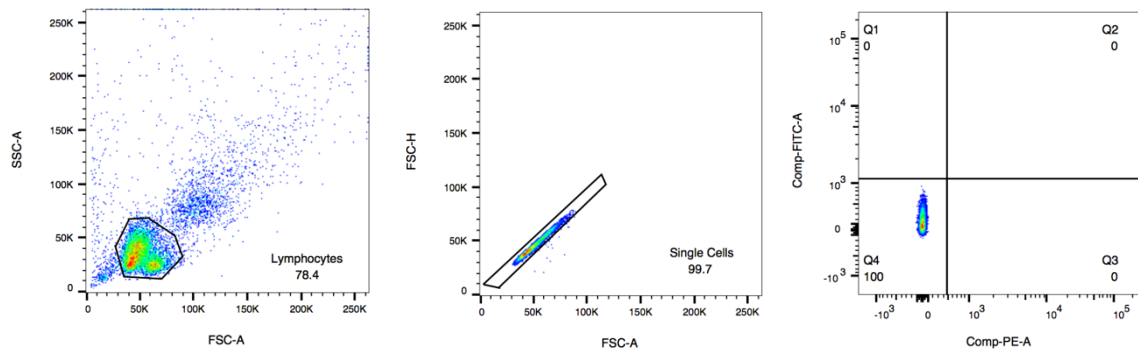
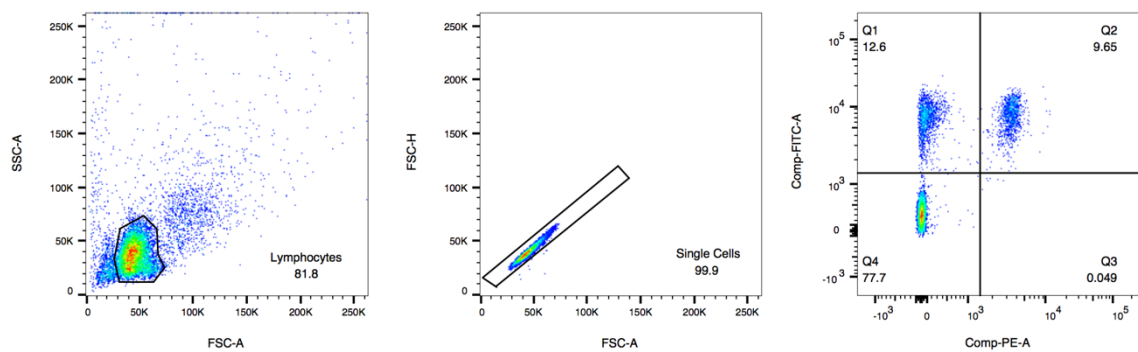
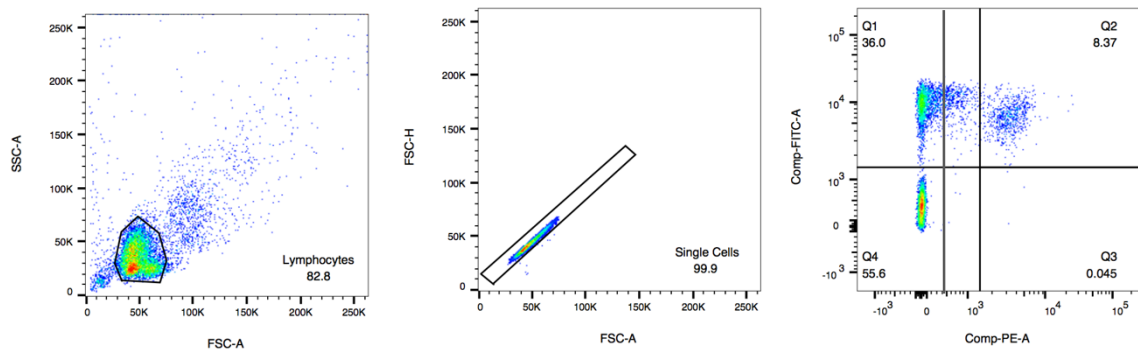
A**B****C**

Abb. 4-17 Typisches Gating der durchflusszytometrischen Messung verschiedener Oberflächenantigene aus Hühnerlymphozyten.

A: CD3⁺-Einzelfärbung (FITC), **B:** CD3⁺ (FITC) und CD4⁺ (PE), **C:** CD3⁺ (FITC) und CD8⁺ (PE) (schwach und intensiv). Von links nach rechts: Isolierung von Lymphozyten, von Einzelzellen und Auftrennung nach Fluoreszenz-Antikörper. SSC-A = Side scatter-Area, FSC-A = Forward scatter-Area, FSC-H = Forward Scatter-Height, Comp = Compensation.

Tabelle 4-5 Prozentualer Anteil der CD3⁺CD4⁺-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl aus FACS-Analyse.
 Angeordnet nach Impfstoffgruppen und nach Lebenstag. Mittel = arithmetisches Mittel der jeweiligen Impfgruppe.

| CD3⁺CD4⁺ | LT 12 | LT 18 | LT 22 | LT 25 | LT 29 | LT 32 | LT 36 |
|------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| PBS | 5.36 | 16.4 | 12.3 | 14.7 | 10.8 | 9.32 | 16.4 |
| | 9.37 | 14.3 | 20.5 | 17.3 | 16.9 | 12.5 | 21.5 |
| | 7.67 | 28.4 | 18.1 | 14.6 | 21.3 | 13.7 | 21.1 |
| | 6.91 | 11.3 | | 14.3 | 14.4 | 11.7 | 19.8 |
| Mittel PBS | 7.29 | 15.35 | 18.1 | 14.65 | 15.65 | 12.1 | 20.45 |
| pcDNA-ChIL-18 | 2.33 | 17.2 | 28 | 15.5 | 18.1 | 15.3 | 24.2 |
| | 4.05 | 11.3 | 15.2 | 16.3 | 11.4 | 12.8 | 16 |
| | 11.8 | 19.6 | 15.6 | 32.3 | 14 | 15.3 | 23.9 |
| | 2.3 | 13.1 | 12.5 | 10.6 | 11.4 | 14.6 | 20.2 |
| | 14.7 | 14.6 | 11.1 | 11.1 | 20.9 | 21.2 | 17.1 |
| | 9.12 | 14 | 20.3 | 12.6 | 19.5 | 27.6 | 35.9 |
| | 6.73 | 22.2 | 15.9 | 9.88 | 5.39 | 15.6 | 11.6 |
| Mittel pcDNA-ChIL-18 | 6.73 | 14.6 | 15.6 | 12.6 | 14 | 15.3 | 20.2 |
| mVLP-gB + pcDNA-ChIL-18 | 13.6 | 17.9 | 13.9 | 15.9 | 13.4 | 17.8 | 14.5 |
| | 15.3 | 34.5 | 17.2 | 16.8 | 9.3 | 13.1 | 16.2 |
| | 12.5 | 13.4 | 16.5 | | 7.58 | 15.5 | 23.7 |
| | 13.1 | 12.7 | 31 | 12.1 | 10.7 | 15.4 | 7.86 |
| | 10.5 | 10.1 | 11.6 | 7.93 | 22.7 | 12.5 | 15.9 |
| | 12.8 | 8.44 | 16.6 | 11.4 | 5.68 | 15.4 | 26.1 |
| | 8.77 | 12.1 | 18.7 | 13.4 | 12.6 | 17.5 | 30.3 |
| Mittel mVLP-gB +pcDNA-ChIL-18 | 12.8 | 12.7 | 16.6 | 12.75 | 10.7 | 15.4 | 16.2 |

Tabelle 4-6 Prozentualer Anteil der CD3⁺CD8⁺-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl aus FACS-Analyse.
 Angeordnet nach Impfstoffgruppen und nach Lebenstag. Mittel = arithmetisches Mittel der jeweiligen Impfstoffgruppe.

| CD3⁺CD8⁺ | LT 12 | LT 18 | LT 22 | LT 25 | LT 29 | LT 32 | LT 36 |
|------------------------------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| PBS | 5.36 | 11.8 | 16 | 11.6 | 8.57 | 10.2 | 13 |
| | 9.51 | 9.59 | 20 | 11.8 | 11.3 | 10.8 | 13.7 |
| | 2.23 | 17.8 | 17.1 | 12.5 | 17.2 | 11.6 | 16.5 |
| | 3.84 | 8.26 | 32.7 | 9.77 | 10.5 | 9.01 | 14.1 |
| Mittel PBS | 4.6 | 10.695 | 18.55 | 11.7 | 10.9 | 10.5 | 13.9 |
| pcDNA-ChIL-18 | 2.63 | 14.5 | 33.7 | 18.4 | 18.4 | 16 | 20.8 |
| | 4.22 | 13.1 | 18.5 | 16.6 | 16.3 | 11.8 | 14.5 |
| | 5.55 | 12.2 | 12.5 | 21.8 | 9.88 | 9.11 | 11.7 |
| | 2.02 | 14.8 | 13.6 | 12.3 | 8.78 | 11.7 | 18.4 |
| | 6.62 | 9.02 | 11.2 | 11 | 16.9 | 14.1 | 14.7 |
| | 8.22 | 19.6 | 24.9 | 14.6 | 21 | 19.4 | 26.4 |
| | 7.42 | 17.7 | 19 | 13.2 | 10 | 15.5 | 12.9 |
| Mittel pcDNA-ChIL-18 | 5.55 | 14.5 | 18.5 | 14.6 | 16.3 | 14.1 | 14.7 |
| mVLP-gB + pcDNA-ChIL-18 | 11.1 | 21.2 | 17.3 | 20.8 | 24 | 20.2 | 14.8 |
| | 9.61 | 31 | 18.5 | 14.7 | 12.9 | 14.4 | 14 |
| | 8.55 | 8.88 | 12 | | 6.82 | 11.1 | 16.1 |
| | 6.79 | 11.2 | 28.7 | 10.1 | 8.42 | 9.23 | 14.9 |
| | 5.59 | 7.66 | 9.92 | 7.83 | 32.9 | 8.14 | 14.6 |
| | 7.85 | 8.44 | 10.7 | 11.2 | 9.45 | 13.9 | 16.5 |
| | 5.64 | 16.9 | 23.7 | 14.5 | 14.3 | 16.6 | 24.6 |
| Mittel mVLP-gB +pcDNA-ChIL-18 | 7.85 | 11.2 | 17.3 | 12.85 | 12.9 | 13.9 | 14.9 |

Der CD4⁺-Antikörper reagierte mit 2,30 % bis 35,90 %, der CD8⁺-Antikörper mit zwischen 2,02 % und 28,70 % der CD3⁺-Lymphozyten des Blutes.

An fünf von sieben Probennahmen war der Anteil der CD4⁺-T-Zellen im Lymphozytenpool der mit PBS immunisierten Kontrollgruppe gegenüber den beiden anderen Impfstoffgruppen erhöht. Insgesamt stieg der prozentuale Anteil von CD4⁺-T-Zellen in allen drei Gruppen an; in den Gruppen „PBS“ und „pcDNA-ChIL-18“ jedoch tendenziell stärker als in der Gruppe, die den kombinierten Impfstoff „mVLP-gB + pcDNA-ChIL-18“ erhielt.

Hinsichtlich des CD8⁺-Anteils überwogen an ebenfalls fünf von sieben Probennahmen die Werte der mit pcDNA-ChIL-18 immunisierten Gruppe gegenüber den Werten der anderen beiden Impfstoffgruppen. Insgesamt stieg auch der prozentuale Anteil der CD8⁺-T-Zellen in allen drei Gruppen an; mit einem Höchstwert von 17,9 % ± 0,6 an LT 22.

Bei der grafischen Auswertung der FACS-Analyse ließ sich die CD8⁺-T-Zellpopulation in zwei Untergruppen untergliedern, welche im Streudiagramm als „schwächer“ und „intensiver“ (dim/bright) antikörpermarkiert erschienen.

Tabelle 4-7 Prozentualer Anteil der beiden CD3⁺CD8⁺-T-Zellsubpopulationen (intensiv/schwach) aus FACS-Analyse.
Angeordnet nach Impfstoffgruppen und nach Lebenstag. Mittel = arithmetisches Mittel der jeweiligen Impfgruppe

| CD3⁺CD8⁺ intensiv/schwach | LT 12 | LT 18 | LT 22 | LT 25 | LT 29 | LT 32 | LT 36 |
|------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| PBS | 5.62 / 4.55 | 2.83 / 8.72 | 1.12 / 8.44 | 0.60 / 4.37 | 1.09 / 4.46 | 0.93 / 4.91 | 0.85 / 5.98 |
| | 3.98 / 7.6 | 2.07 / 6.47 | 0.92 / 9.6 | 0.58 / 4.32 | 1.19 / 6.15 | 0.71 / 4.48 | 0.70 / 5.65 |
| | 2.84 / 1.65 | 3.73 / 14.04 | 1.11 / 9.01 | 0.70 / 5.16 | 1.05 / 8.83 | 0.82 / 5.23 | 0.91 / 7.85 |
| | 2.46 / 2.73 | 4.04 / 6.62 | 1.68 / 20.5 | 1.00 / 4.88 | 1.22 / 5.76 | 1.32 / 5.13 | 1.03 / 7.17 |
| Mittel PBS | 3.73 / 4.13 | 3.17 / 8.96 | 1.21 / 11.89 | 0.72 / 4.68 | 1.14 / 6.30 | 0.95 / 4.94 | 0.87 / 6.66 |
| pcDNA-ChIL-18 | 3.87 / 2.09 | 4.94 / 12.06 | 1.29 / 19 | 1.16 / 9.88 | 1.30 / 10.41 | 0.92 / 7.66 | 1.33 / 11.86 |
| | 5.39 / 3.56 | 6.53 / 11.36 | 1.34 / 10.61 | 0.76 / 7.19 | 1.13 / 8.65 | 0.66 / 4.68 | 1.02 / 7.31 |
| | 5.85 / 4.74 | 5.67 / 10.37 | 1.34 / 7.15 | 0.86 / 10.1 | 1.43 / 5.81 | 0.80 / 4.04 | 0.85 / 5.38 |
| | 2.96 / 1.51 | 7.41 / 13.04 | 0.99 / 6.77 | 0.58 / 4.5 | 1.05 / 4.5 | 0.76 / 5.06 | 0.77 / 8 |
| | 4.81 / 5.48 | 2.11 / 6.12 | 0.94 / 5.42 | 0.60 / 4.14 | 1.12 / 8.94 | 0.85 / 6.49 | 0.71 / 6.11 |
| | 7.06 / 7.2 | 4.70 / 16.16 | 1.37 / 14.4 | 1.53 / 8.84 | 1.02 / 10.6 | 1.53 / 11.72 | 1.36 / 15.2 |
| | 4.80 / 6.14 | 3.84 / 14.04 | 1.00 / 9.49 | 0.77 / 5.74 | 0.71 / 4.14 | 0.78 / 6.79 | 1.10 / 6.77 |
| Mittel pcDNA-ChIL-18 | 4.96 / 4.39 | 5.03 / 11.88 | 1.18 / 10.41 | 0.90 / 7.20 | 1.11 / 7.58 | 0.90 / 6.63 | 1.02 / 8.66 |
| mVLP-gB + pcDNA-ChIL-18 | 3.32 / 8.53 | 2.93 / 15.81 | 1.15 / 9.25 | 1.22 / 11.42 | 1.22 / 13.2 | 0.74 / 8.6 | 0.94 / 7.16 |
| | 3.71 / 7.57 | 5.77 / 26.42 | 0.97 / 9.12 | 0.67 / 5.91 | 0.79 / 5.71 | 0.66 / 5.74 | 0.90 / 6.64 |
| | 2.31 / 5.97 | 3.02 / 6.67 | 0.90 / 5.7 | 0.72 / 5.2 | 1.04 / 3.48 | 0.73 / 4.69 | 0.73 / 6.8 |
| | 2.43 / 4.81 | 3.73 / 8.83 | 1.28 / 16.1 | 0.90 / 4.79 | 1.35 / 4.83 | 1.10 / 4.83 | 1.08 / 7.75 |
| | 3.05 / 4.21 | 7.42 / 6.75 | 1.38 / 5.76 | 0.93 / 3.77 | 1.61 / 20.3 | 1.16 / 4.38 | 1.25 / 8.11 |
| | 4.27 / 6.36 | 5.75 / 7.19 | 1.46 / 6.35 | 0.74 / 4.77 | 1.10 / 4.96 | 0.80 / 6.18 | 1.07 / 8.53 |
| | 5.34 / 4.75 | 4.33 / 13.73 | 1.46 / 14.07 | 0.72 / 6.08 | 0.79 / 6.32 | 0.97 / 8.19 | 1.26 / 13.7 |
| Mittel mVLP-gB + pcDNA-ChIL-18 | 3.49 / 6.03 | 4.71 / 12.20 | 1.23 / 9.48 | 0.84 / 5.99 | 1.13 / 8.40 | 0.88 / 6.09 | 1.03 / 8.38 |

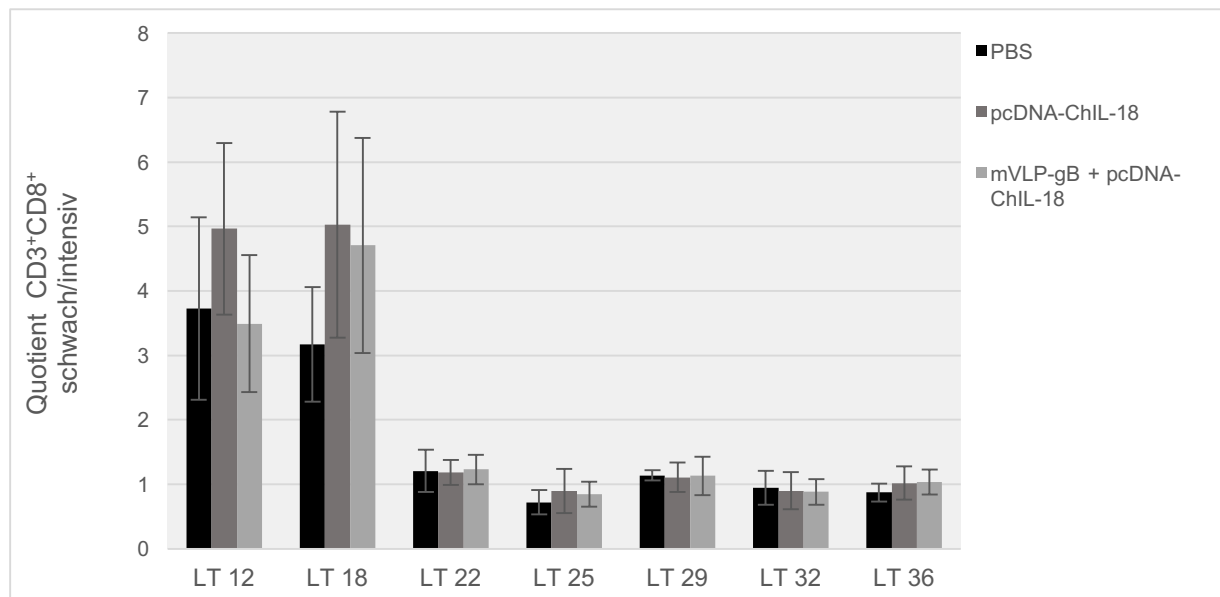


Abb. 4-18 Verhältnis zwischen schwacher und intensiver $CD3^+CD8^+$ -T-Lymphozytensubpopulation in Versuchsansatz C.

Bestimmung per FACS-Analyse. Untersucht wurden Citratblutproben von LT 12, 18, 22, 25, 29, 32 und 36. Darstellung des Verhältnisses in jeder Impfgruppe.

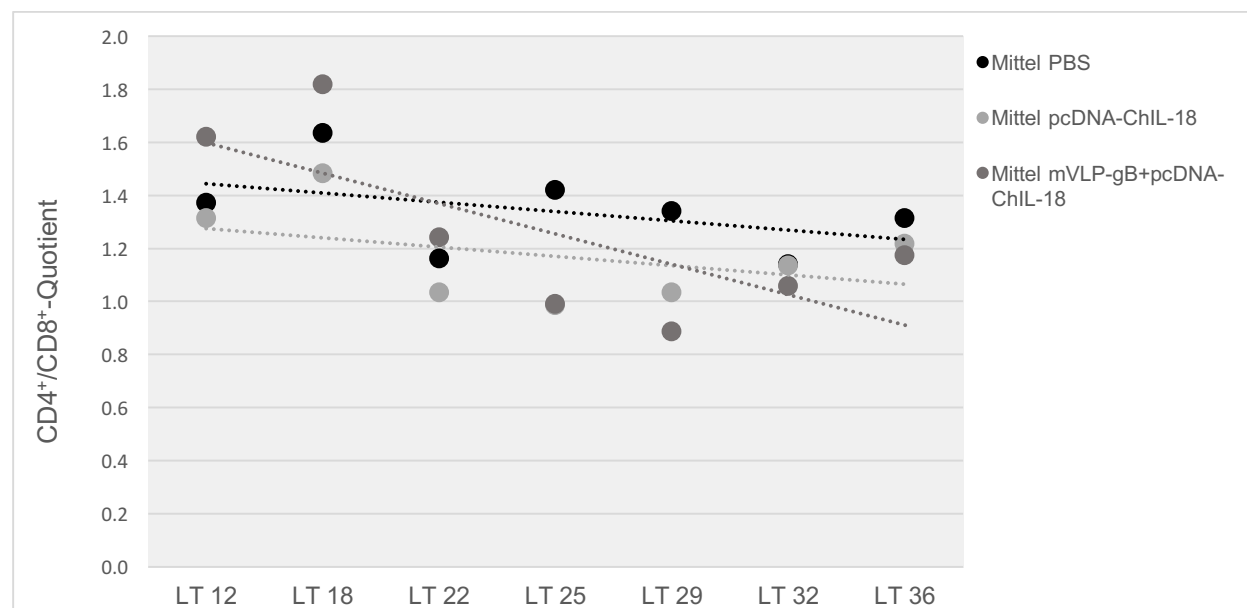
Ein Vergleich des Verhältnisses zwischen der schwach und der intensiv fluoreszierenden Population erbrachte ein Überwiegen des Anteils der schwach gefärbten $CD8^+$ -T-Zellen an LT 12 und 18 mit starken Schwankungen zwischen den einzelnen Individuen der Impfgruppen. In der mit PBS geimpften Gruppe war der Anteil der schwachen $CD8^+$ -T-Zellen dabei am geringsten, in der Gruppe, die pcDNA-ChIL-18 erhalten hatte, am höchsten.

Zu den darauffolgenden Messzeitpunkten (LT 22, 25, 29, 32 und 36) war der prozentuale Anteil beider Zellpopulationen in allen Impfgruppen weitgehend ausgeglichen.

Tabelle 4-8 CD4⁺/CD8⁺-Quotient aus FACS-Analyse.

Angeordnet nach Impfstoffgruppen und nach Lebenstag. Mittel = arithmetisches Mittel in der jeweiligen Impfgruppe.

| CD4⁺/CD8⁺- Quotient | LT 12 | LT 18 | LT 22 | LT 25 | LT 29 | LT 32 | LT 36 |
|------------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| PBS | 1.019 | 1.591 | 0.939 | 1.393 | 1.292 | 0.901 | 1.219 |
| | 1.019 | 1.414 | 1.084 | 1.454 | 1.486 | 1.166 | 1.433 |
| | 1.047 | 1.804 | 1.194 | 1.196 | 1.293 | 1.182 | 1.290 |
| | 2.392 | 1.724 | 1.419 | 1.630 | 1.284 | 1.309 | 1.308 |
| Mittel PBS | 1.369 | 1.633 | 1.159 | 1.418 | 1.339 | 1.140 | 1.313 |
| pcDNA-ChIL-18 | | 1.319 | 0.885 | 0.819 | 0.985 | 0.945 | 1.089 |
| | 1.034 | 1.028 | 1.033 | 1.146 | 0.741 | 1.038 | 0.885 |
| | 1.735 | 2.819 | 1.349 | 1.449 | 1.424 | 1.395 | 1.898 |
| | 1.196 | 1.203 | 1.053 | 0.925 | 1.291 | 1.035 | 1.053 |
| | 1.876 | 1.743 | 1.120 | 1.033 | 1.257 | 1.329 | 1.224 |
| | 1.142 | 1.010 | 0.904 | 0.846 | 0.962 | 1.312 | 1.436 |
| | 0.894 | 1.242 | 0.875 | 0.669 | 0.573 | 0.874 | 0.926 |
| Mittel pcDNA-ChIL-18 | 1.313 | 1.481 | 1.031 | 0.984 | 1.033 | 1.133 | 1.216 |
| mVLP-gB + pcDNA-ChIL-18 | 1.277 | 2.914 | 0.892 | 0.853 | 0.614 | 0.758 | 0.997 |
| | 1.620 | 1.312 | 1.099 | 0.913 | 0.828 | 0.807 | 1.339 |
| | 1.443 | 2.213 | 1.592 | 0.835 | 1.111 | 1.189 | 1.478 |
| | 1.942 | 2.019 | 1.150 | 1.274 | 1.339 | 1.365 | 0.554 |
| | 1.858 | 1.454 | 1.360 | 1.084 | 0.663 | 1.294 | 1.209 |
| | 1.678 | 1.598 | 1.670 | 1.078 | 0.704 | 1.037 | 1.504 |
| | 1.520 | 1.209 | 0.911 | 0.890 | 0.933 | 0.948 | 1.130 |
| Mittel mVLP-gB +pcDNA-ChIL-18 | 1.620 | 1.817 | 1.239 | 0.990 | 0.884 | 1.057 | 1.173 |

**Abb. 4-19 CD4⁺/CD8⁺-Quotient der T-Lymphozyten in Versuchsansatz C.**

Bestimmung per FACS-Analyse. Untersucht wurden Citratblutproben von LT 12, 18, 22, 25, 29, 32 und 36. Darstellung des arithmetischen Mittels jeder Impfgruppe, sowie von Trendlinien im Zeitverlauf der einzelnen Gruppen.

Eine Verstärkung der zellulären Effektormechanismen äußert sich in einer Zunahme der CD8⁺-T-Zellen und damit einer Verringerung des CD4⁺/CD8⁺-Quotienten.

Wie die Trendgeraden aufzeigen, ist dies der Fall bei allen drei Gruppen. Die Zunahme fällt zwischen LT 12 und LT 36 in der Gruppe „PBS“ von 1,369 zu 1,313 um 0,056, in der Gruppe „pcDNA-ChIL-18“ von 1,313 zu 1,216 um 0,097 und in der Gruppe „mVLP-gB + pcDNA-ChIL-18“ von 1,620 auf 1,173 am deutlichsten um 0,447 zugunsten der CD8⁺-T-Zellen. Während also die Entwicklung bei den mit pcDNA-ChIL-18 vakzinierten Tiere annähernd parallel zu den Tieren der Negativkontrolle verläuft, ist die Verschiebung bei der Gruppe „mVLP-gB + pcDNA-ChIL-18“ zugunsten des CD8⁺-Anteils im Zeitverlauf verstärkt. Jedoch ist dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

4.2.3.2.2 ELISpot-Assay zur Quantifizierung aktivierter T-Lymphozyten

Zur Bestimmung der zellulären Immunantwort anhand der Zahl aktivierter (INF- γ sezernierender) T-Lymphozyten diente der ELISpot-Assay.

In Versuch A wurde die Lymphozytenfraktion aus der Milz und dem Thymus von je der Hälfte der Tiere einer Impfgruppe an den Tagen 14 und 42 isoliert und mittels ELISpot-Assay auf das Vorhandensein aktivierter Lymphozyten hin untersucht.

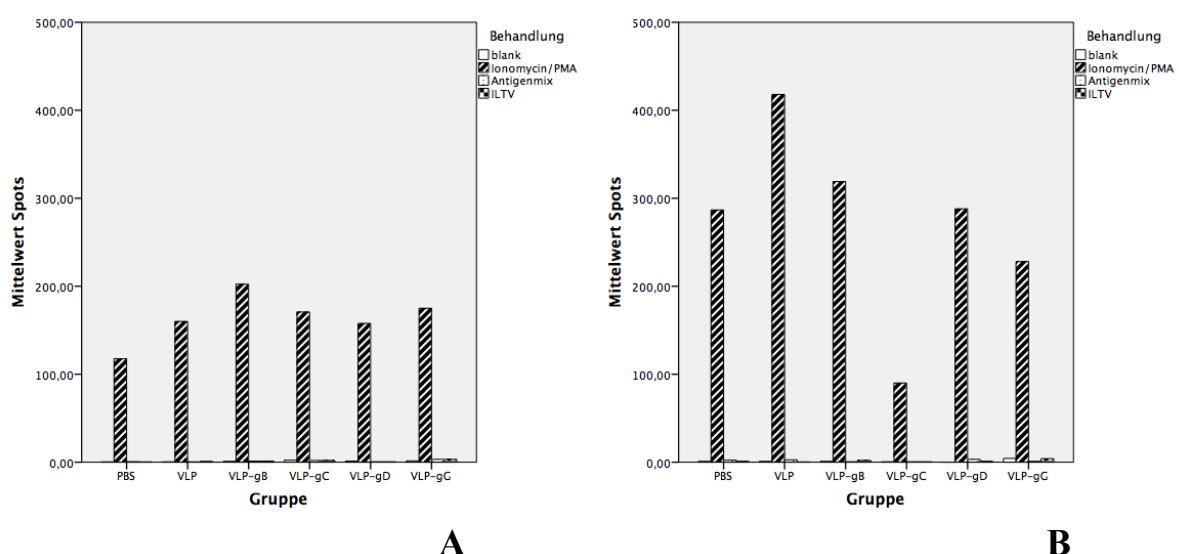


Abb. 4-20 ELISpot aus Lymphozyten der Milz von Tieren aus Versuch A.

Anordnung nach Impfstoffgruppe. Die T-Zell-aktivierende Substanz Ionomycin/PMA diente hierbei als Positivkontrolle. „blank“ bezeichnet die Negativkontrolle. ELISpot von Milzlymphozyten (5×10^4 Zellen) an LT 14 (A) und LT 42 (B).

Die Einzelmesswerte (nicht dargestellt) nach Stimulation der Lymphozyten mit dem T-Zell-aktivierenden Ionomycin/PMA variieren für die Milzproben zwischen 40 und 300 gezählter Spots an LT 14 und zwischen 49 und 501 Spots an LT 42. Somit heben sie sich signifikant von den Werten der Negativkontrolle (blank) ab.

Durch Behandlung mit den ILTV-Glykoproteinen ist dagegen keine Stimulation im ELISpot zu beobachten. Ebenso führt der Einsatz des gesamten Virus (ILTV) nicht zu erhöhter Expression von INF- γ .

Die Einzelmesswerte (nicht dargestellt) für die Lymphozyten des Thymus nach Stimulation mit Ionomycin/PMA unterscheiden sich nur an LT 14 von der Anzahl erfasster Spots in den Proben der Negativkontrolle. Sie umfassen eine Verteilung von vier bis 57 aktivierten T-Lymphozyten.

Auch hier ruft weder die Behandlung mit ILT-Antigenmix noch mit dem Virus selbst eine Stimulation der zellulären Immunreaktion hervor, die per ELISpot-Assay nachweisbar ist. An LT 42 ist keinerlei Immunantwort durch den ELISpot-Assay darstellbar.

In Versuch C wurde die Lymphozytenfraktion aus der Milz aller Tiere an Tag 36 isoliert und mittels ELISpot-Assay auf das Vorhandensein aktivierter Lymphozyten hin untersucht.

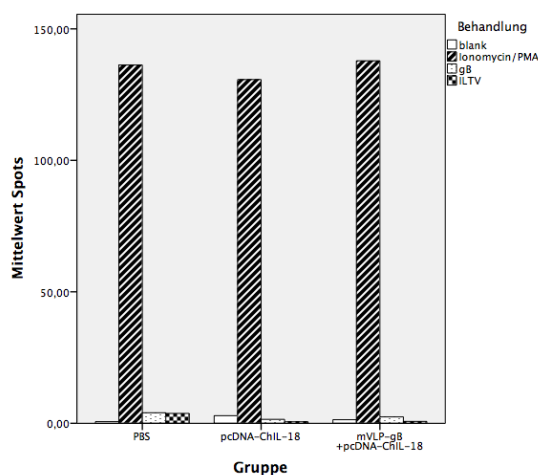


Abb. 4-21 ELISpot aus Lymphozyten der Milz der Tiere aus Versuch C an LT 36.

Anordnung nach Impfstoffgruppe (PBS, pcDNA-ChIL-18, VLP-gB + pcDNA-ChIL-18). Die Lymphozyten jeder Probe (jeweils 5×10^4 Zellen) wurden durch je vier verschiedene Behandlungen zur INF- γ -Sekretion angeregt. Die T-Zell-aktivierende Substanz Ionomycin/PMA diente hierbei als Positivkontrolle. „blank“ bezeichnet die Negativkontrolle.

Die Stimulation mit Ionomycin/PMA resultierte in ≥ 80 zählbaren Spots pro Probe, wohingegen die Anzahl der Spots weder nach Stimulation mit gB, noch mit dem kompletten ILT-Virus zu signifikanten Abweichungen von den Werten der Negativkontrolle führte. Somit war keine Aktivierung der zellulären Immunantwort in Versuch C mittels ELISpot-Assay messbar.

4.2.3.2.3 Nachweis von Interleukin-mRNA

Mittels qRT-PCR wurde in den Versuchsansätzen B und C anhand regelmäßig, im Abstand von drei bis vier Tagen entnommener Blutproben, sowie in Organproben, welche nach Abschluss des *in-vivo*-Versuches an LT 36 entnommen wurden, die Expression der als DNA-Vakzine verabreichten Adjuvantien ChIL-2 und ChIL-18 überprüft. Die Erfassung von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), einem Enzym der Glykolyse, diente als Referenzgen, um die Vergleichbarkeit der Expression von ChIL-18 in den verschiedenen, untersuchten Geweben zu gewährleisten.

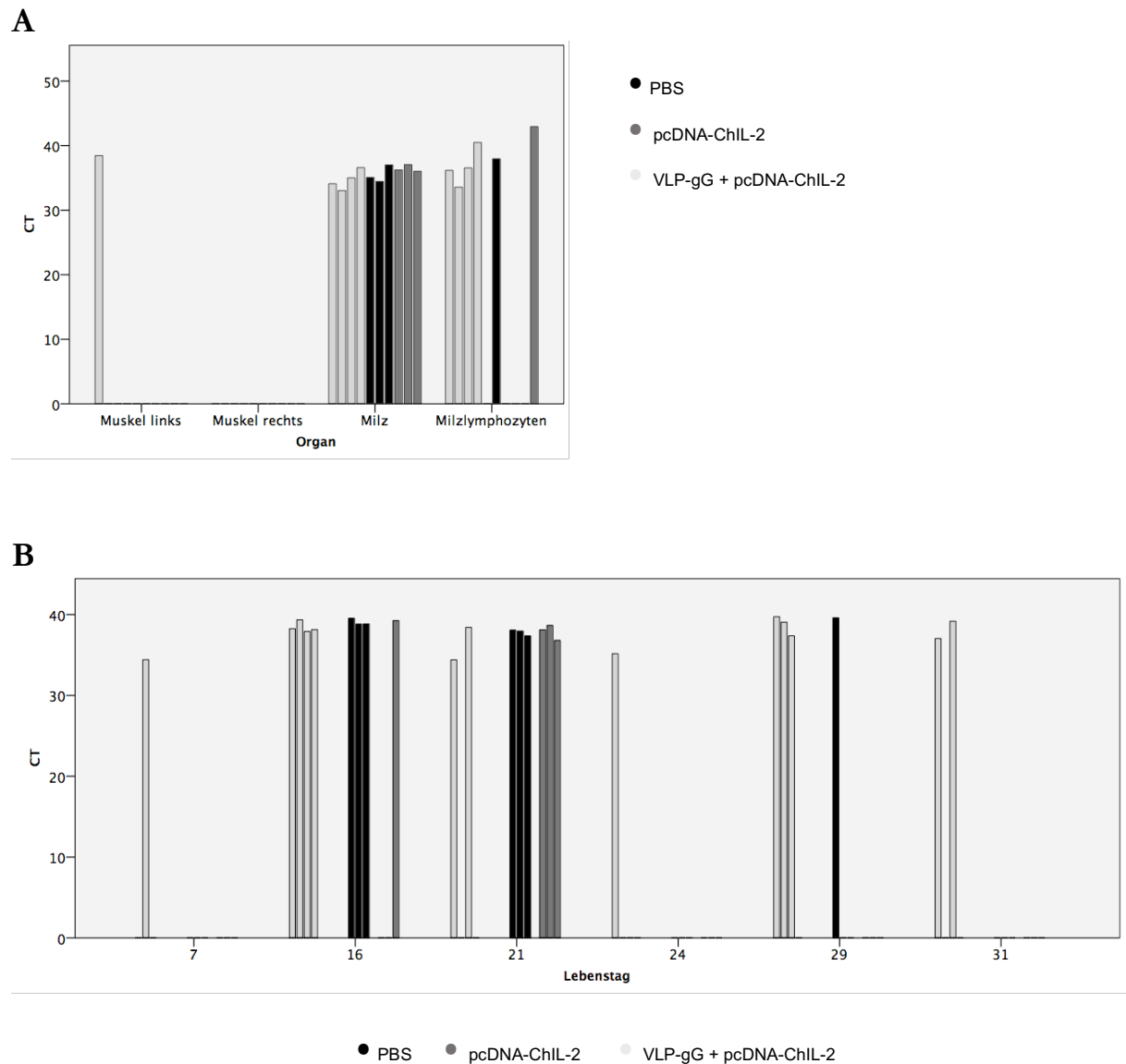


Abb. 4-22 Detektion von Genomsequenzen von ChIL-2 mittels qRT-PCR.

Nach RNA-Extraktion aus **A.** Organen von LT 35, sowie in **B.** regelmäßig entnommenen Blutproben des ILTV-Vakzinationsexperimentes B.

ChIL-2-RNA ließ sich in der Milz aller Tiere von Versuch B, sowie in den Milzlymphozyten von Tieren aller drei Impfgruppen nachweisen. Darüber hinaus war die Detektion in der Muskulatur eines der mit VLP-gG + pcDNA-ChIL-2 immunisierten Tiere erfolgreich.

Im Kreislauf ließ sich die Expression von ChIL-2 an allen Tagen in der Gruppe „VLP-gG + pcDNA-ChIL-2“ nachvollziehen. An den Tagen 16 und 21 war ChIL-2-RNA in allen drei Gruppen detektierbar. Hinsichtlich der Expressionsstärke, bestimmt mittels des CT-Wertes, traten keine Unterschiede zwischen den Geweben und Impfgruppen zutage.

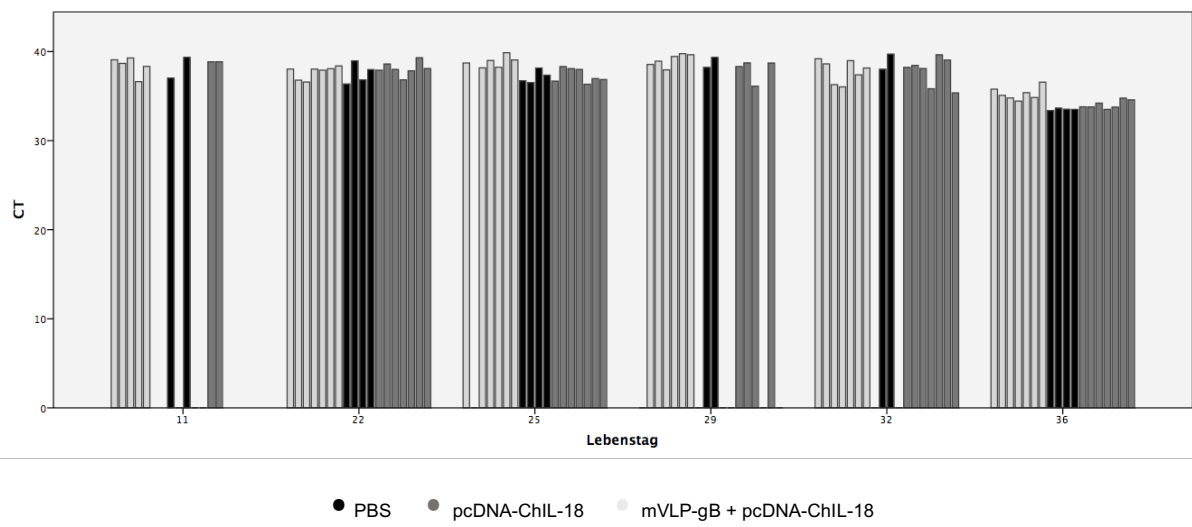
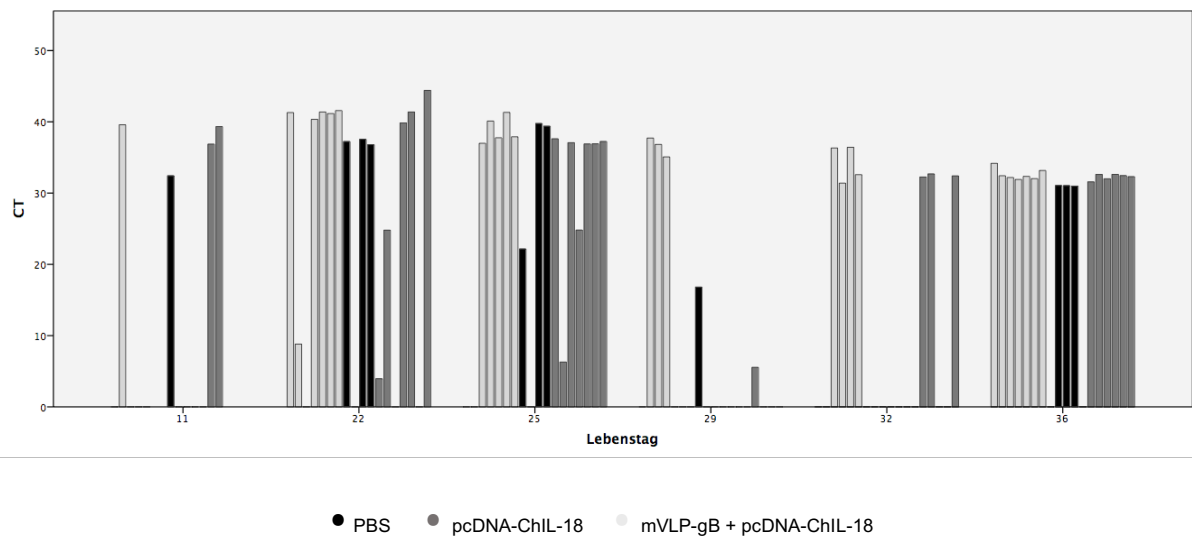
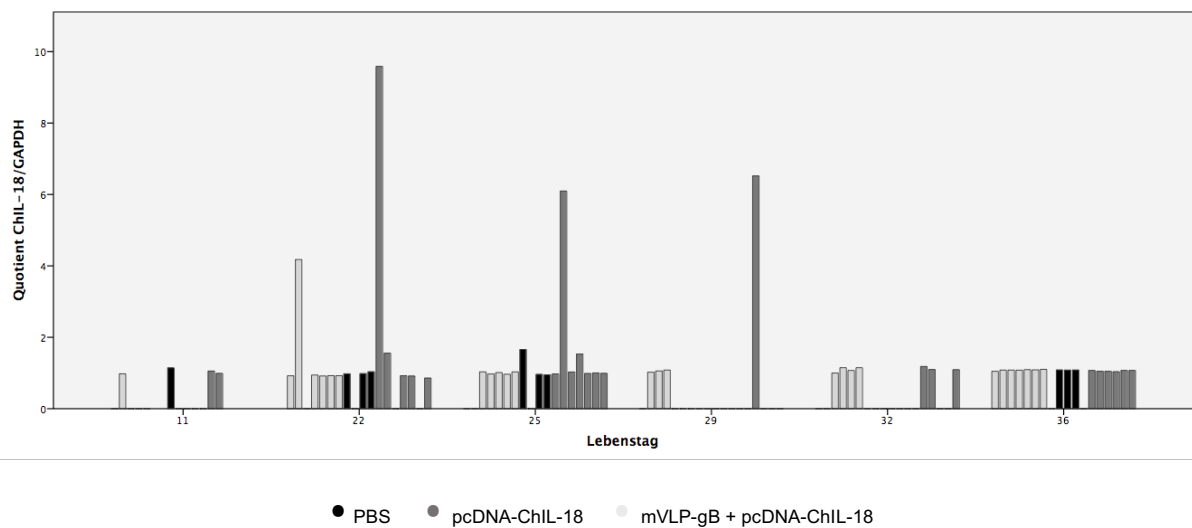
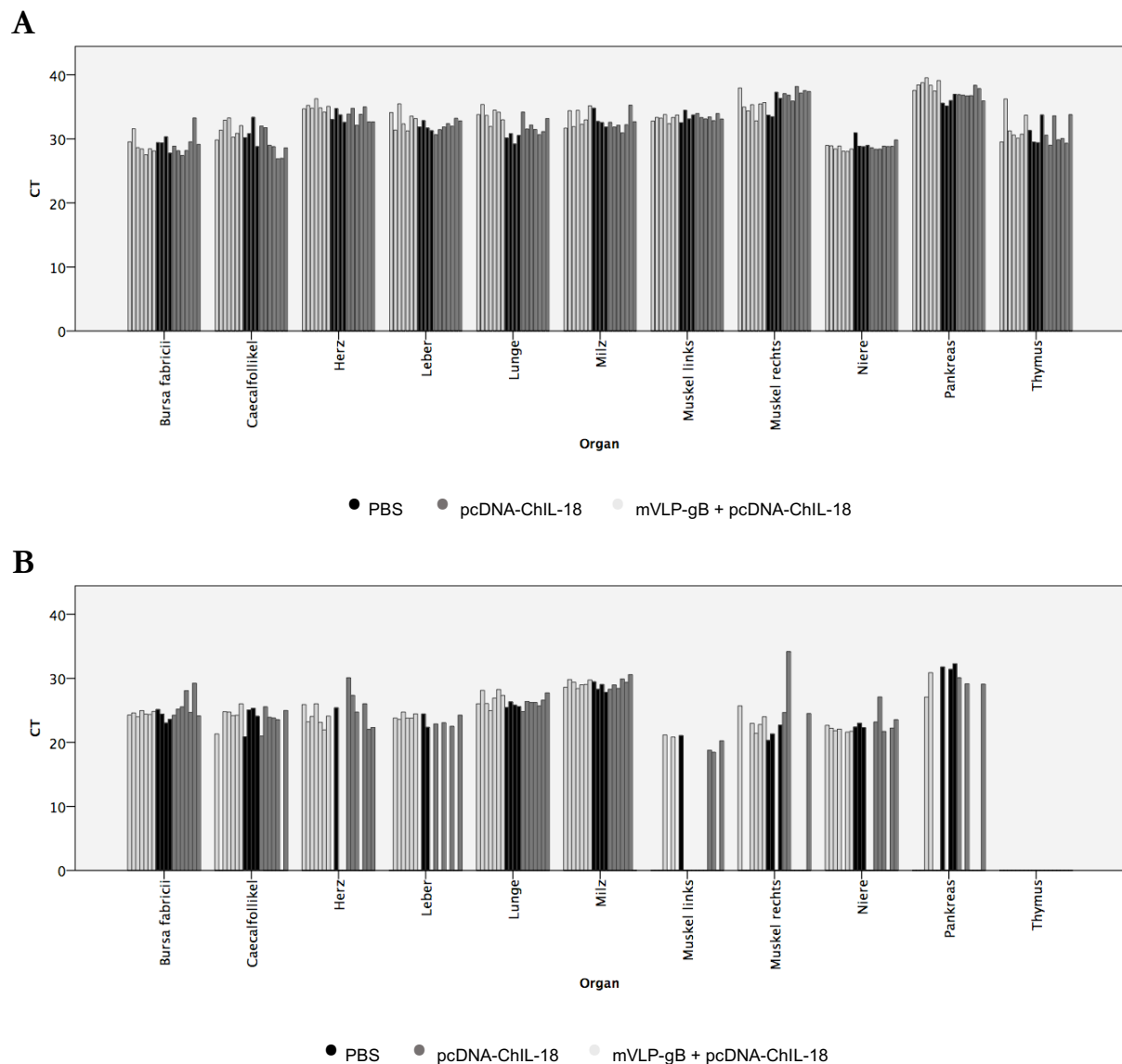
A**B****C**

Abb. 4-23 Detektion von Genomsequenzen mittels qRT-PCR aus regelmäßig entnommenen Blutproben.

Aus ILTV-Vakzinationsexperiment C. **A.** Nachweis von ChIL-18. **B.** Nachweis von GAPDH. **C.** Verhältnis der CT-Werte von ChIL-18 und GAPDH.

Die Expression von ChIL-18 war an allen Untersuchungstagen im Blut in fast allen Proben nachweisbar. Es traten keine Unterschiede hinsichtlich des CT-Wertes auf. Obgleich die Detektion von GAPDH während der einzelnen Tage, sowie innerhalb und zwischen den einzelnen Proben starke Schwankungen offenlegte, konnte davon kein Unterschied im Verhältnis zwischen ChIL-18 und GAPDH zwischen den einzelnen Impfgruppen oder den verschiedenen Lebenstagen abgeleitet werden.



C

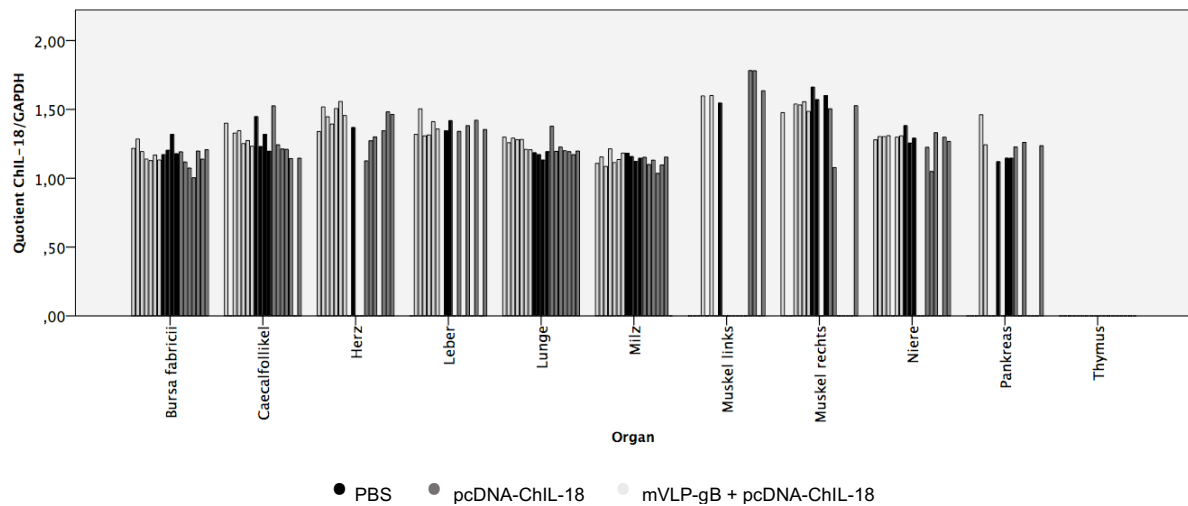


Abb. 4-24 Detektion von Genomsequenzen mittels qRT-PCR aus Organproben.

Von Tieren des ILTV-Vakzinationsexperimentes C. **A.** Nachweis von ChIL-18. **B.** Nachweis von GAPDH. **C.** Verhältnis der CT-Werte von ChIL-18 und GAPDH.

In allen untersuchten Organen war ChIL-18-RNA nachweisbar. Während der Nachweis in einzelnen Organen, wie der Niere, tendenziell schwächer ausfiel als in anderen (Muskulatur und Pankreas), waren keine Abweichungen im CT-Wert zwischen den verschiedenen Impfgruppen festzustellen. Der Vergleich des Quotienten von ChIL-18 und GAPDH erbrachte dasselbe Ergebnis.

5 DISKUSSION

5.1 Charakterisierung der VLPs

Zur Charakterisierung der VLPs wurde die Expression des VLP-„Grundgerüsts“ und der ILTV-Glykoproteine auf deren Oberfläche untersucht.

Die Antigene gB700, gC385, gD307 und gGA1-26 wurden von den jeweiligen Glykoproteinen des ILTV abgeleitet. Die drei erst genannten Glykoproteine gelten als dessen Hauptimmunogene (Fahey & York, 1990; Veits et al., 2003). Mit Ausnahme ihrer Transmembrandomäne und des C-terminalen Abschnittes bzw. der Signalsequenz zur Sekretion von gG umfassen sie die gesamte N-terminale Region und damit alle Sequenzabschnitte mit potentieller Relevanz für die immunogene Wirkung. Die Sequenz für das VLP-Grundgerüst ist vom MMLV abgeleitet und codiert nur für dessen *gag*-Protein.

Anhand der Ergebnisse der Western-Blot-Analyse konnte die Expression der ILTV-Glykoproteine und des *gag*-Proteins nach Transfektion und VLP-Gewinnung nachgewiesen werden. Die visuelle Beurteilung der morphologischen Integrität der Partikel konnte mittels Transmissionselektronenmikroskopie bestätigt werden.

Zur Quantifizierung der hergestellten VLPs und als Grundlage zur Bestimmung der Impfstoffdosis diente einerseits die Konzentration der auf der VLP-Oberfläche exponierten Glykoproteine, andererseits des *gag*-Proteins als Vergleichswert für die Anzahl der produzierten VLPs, welche mittels indirektem ELISA ermittelt wurden.

5.2 Modifikation der VLPs - Maleylierung

Die Modifikation von VLP-gB durch Maleylanhydrid wurde zur Aktivierung von Scavenger-Rezeptoren eingesetzt, da dies die Modulation der Immunantwort zugunsten zellulärer Immunmechanismen erlaubt, was gleichzeitig zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion und zur Unterdrückung der Antikörper basierten Antwort beiträgt (Abraham et al., 1995; He et al., 2009; Singh et al., 1998; Vandaveer et al., 2001).

Die erfolgreiche Modifikation von VLP-gB mit Maleylgruppen wurde zunächst *in vitro* verifiziert. Wie die Bestimmung der freien Aminogruppen zeigte, ist deren Anteil auf

unbehandeltem VLP-gB höher als auf dem maleylierten mVLP-gB, was für eine erfolgreiche Modifikation spricht. Vergleichbare Werte ergaben sich für BSA bzw. maleyliertes BSA, welches als Kontrolle diente.

Die immunogene Wirkung maleylierter Proteine im aviären Organismus wurde in einer Studie von Vandaveer et al. (2001) beschrieben. Darin wurde die Wirkung von Maleyl-BSA hinsichtlich der Immunreaktion beim Huhn untersucht. Sie zeigten dessen rezeptorspezifische Bindung an eine aviäre Makrophagenzelllinie, sowie die Modulation der Immunantwort *in vivo* hin zu einer Verstärkung der zellulären Reaktionen und einer abgeschwächten Antikörperproduktion im Vergleich zu nicht modifiziertem BSA. Darüber hinaus wurde eine durch Antigen stimulierte INF- γ -Produktion in Splenozyten nachgewiesen. Die Verabreichung erfolgte, vergleichbar dem Vorgehen in der vorliegenden Arbeit, einmalig intramuskulär, allerdings in einer Dosierung von 2,5 mg bzw. 1,4 mg pro Tier und im Alter von 6 bzw. 27 Wochen entgegen 0,25 mg des Antigens gB im Alter von 2 Wochen in Versuch C.

5.3 Charakterisierung der ChIL exprimierenden Plasmide

Die beiden verwendeten Vektoren unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre Promotoren. Dabei wird die Expression von pcDNA3.1 durch den Promotor des Cytomegalievirus (CMV) und von pCAGGS durch den modifizierten Hühner- β -Aktin-Promotor in Kombination mit einem CMV-Verstärkerelement (CAGG) (Niwa et al., 1991) gesteuert. Die Expression von ChIL-2 und ChIL-18 durch die beiden Vektoren pcDNA und pCAGGS wurde *in vitro* auf Transkriptions- und Translationsebene verglichen.

Die Expression der Interleukine ChIL-2 und ChIL-18 konnte mit beiden Expressionsvektoren induziert werden. Dabei konnten weder auf mRNA- noch auf Proteinebene signifikante Unterschiede zwischen den Expressionsleveln festgestellt werden. Andere vergleichende Studien zur Stärke des CMV- Promotors erbrachten bereits, dass dieser eine hohe Aktivität in verschiedenen Säugerzelllinien zeigt (Foecking & Hofstetter, 1986). Darüber hinaus konnte diese hohe Aktivität auch in aviären Zelllinien bestätigt werden (Lee et al., 1999; Suarez & Schultz-Cherry, 2000). Das Plasmid pCAGGS wurde eigens für die Expression in Geflügelzellen entwickelt und fand daher häufig Anwendung in Studien zur DNA-Vakzination von Geflügel (Gao et al., 2013; Jiang et al., 2007; K. Li et al., 2013; Ogunremi et al., 2013; Shan et al., 2011). Im Gegensatz zu den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit mit LMH-Zellen aviären Ursprungs konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass der

CAGG-Promotor in verschiedenen Säugetierzellen stärker als der unter anderem getestete CMV-Promotor ist (Miyazaki et al., 1989; Qin et al., 2010).

Beim Nachweis der Interleukine mittels Western Blot fiel auf, dass ChIL-2 fast ausschließlich im Zellüberstand, ChIL-18 dagegen nur im Lysat detektierbar war. Diese Beobachtung stimmt mit den für die entsprechenden Säuger-Interleukine beschriebenen Sekretionswegen überein: Interleukin 2 enthält ein klassisches Signalpeptid und verfügt darüber hinaus über eine Glykosylierungssequenz, welche den intrazellulären Transport durch das Endoplasmatische Retikulum und zum Golgi-Apparat steuert, wo das Zytokin in sekretorische Vesikel verpackt wird. Daher ist die Sekretion unabhängig vom Zelltyp möglich. Die Beobachtung, dass ChIL-2 nach Transfektion vorwiegend im Zellüberstand nachweisbar ist, steht in Übereinstimmung mit einer Studie von You et al. (2007).

Interleukin 18 dagegen zählt zu einer Gruppe von Zytokinen, welche keine Signalsequenz besitzt und nicht durch Exozytose in den extrazellulären Raum gelangt. Anstelle dessen wird es durch spezifische Transmembrantransporter sezerniert oder in Lysosomen verpackt gespeichert (Stanley & Lacy, 2010; Stow & Murray, 2013). Diesen Sekretionsmechanismus scheint es in LMH-Zellen, welche auf Epithelzellen eines Leberkarzinoms basieren, nicht zu geben.

Die Größe der stärkeren Banden im Western Blot für ChIL-2 beträgt etwa 10 kDa. Dies entspricht etwa der Masse des 121 Aminosäuren umfassenden biologisch aktiven Interleukins 2. Eine zweite Bande befindet sich bei etwa 20 kDa und stellt möglicherweise das Vorläuferprotein von ChIL-2 dar (Stanley & Lacy, 2010; Sundick & Gill-Dixon, 1997). Hinsichtlich ChIL-18 entspricht die Größe der stärksten Bande (etwa 20 kDa) der Masse seines 198 Aminosäuren umfassenden Vorläuferproteins. Eine zweite, intensive Bande lässt sich zwischen 10 und 17 kDa lokalisieren. Dies stimmt mit der Größe des biologisch aktiven Interleukins von 169 Aminosäuren überein. Warum diese Bande und weitere, schwächere Banden, welche womöglich diversen Spleiß- oder Spaltprodukten geschuldet sind, nur nach Expression durch den CMV-Promotor nachweisbar sind, kann nicht erklärt werden.

5.4 Impfkonzzept

5.4.1 DNA-Adjuvantien

In den Versuchsansätzen B und C wurde jeweils die adjuvante Wirkung eines plasmidcodierten Interleukins als Zusatz zur grundlegenden Komponente des Impfstoffes, den ILTV-Antigen präsentierenden VLPs, untersucht. Die Verabreichung gliederte sich in die Grundimmunisierung an ED 18 *in ovo* und eine Wiederholungsimpfung an LT 14 durch intramuskuläre Injektion bzw. die alleinige Verabreichung an LT 14.

Die Applikation von DNA als Vakzin oder Adjuvans ist bei Geflügel im Vergleich zum Säuger ein wenig erforschtes Gebiet und obgleich die Induktion von humoralen und zellulären Immunreaktionen, wie auch der Schutz vor Erkrankung experimentell im Huhn nachgewiesen wurde, erlangte bislang kein DNA-basierter Impfstoff die Marktzulassung (Meunier et al., 2016). In einer Studie zum Schutz vor IBD wurde die Wirksamkeit der DNA-Vakzination mittels eines für IBDV-Antigene codierenden Plasmides nach *in-ovo*-Applikation à 100 µg, gefolgt von einer Wiederholungsimpfung mit Totimpfstoff erfolgreich untersucht. Dabei führte jedoch die zusätzliche Verabreichung eines für ChIL-2 oder ChINF-γ codierenden Plasmides (zu je 50 µg) nicht zur Verstärkung der Schutzwirkung (J. H. Park et al., 2009). In einer weiteren Studie konnte der Mortalität nach Infektion mit ILTV mittels eines DNA-Vakzins vorgebeugt werden (Chen, Zhao, et al., 2010). Hierbei wurde ein bicistronisches Plasmid eingesetzt, welches neben dem ILTV-Glykoprotein B auch für Interleukin 18 codierte, wobei das Interleukin als Adjuvans einen positiven Effekt auf den Immunstatus hatte.

5.4.2 Applikationsmethode und Auffrischungsimpfungen

Anhand des IBV-Modells wurde festgestellt, dass eine einzelne Injektion von DNA *in ovo* nicht ausreichend ist, um eine schützende Antwort zu generieren, welche auf der Expression des codierten Antigens gründet. Jedoch führte eine Wiederholungsimpfung an LT 7 oder LT 14 mit attenuierten Lebendimpfstoffen oder mit Vektorvakzin zu belastbarem Schutz (Haygreen et al., 2006; Kapczynski et al., 2003; Park et al., 2009). Auch durch eine Auffrischungsimpfung mit DNA-Vakzin konnte ein partieller Schutz hervorgerufen werden (Ding et al., 2005).

Ungeachtet des Applikationsweges der Erstimpfung stimmen viele Studien in der Beobachtung überein, dass zur Etablierung einer belastbaren Immunantwort mindestens eine Auffrischungsimpfung nötig ist (Chang et al., 2002; Ding et al., 2012; Gao et al., 2013; Gong et al., 2013; Jiang et al., 2007; Le Gall-Reculé et al., 2007). Diese Strategie wurde auch bei Versuch B der vorliegenden Arbeit verfolgt und darüber hinaus die von Oshop et al. (2003) und Haygreen et al. (2006) beschriebene Methode zur Steigerung der Effizienz bei *in-ovo*-Applikation von DNA durch den Zusatz von Unvollständigem Freundischem Adjuvans (Incomplete Freund's Adjuvans, IFA) und DMSO angewandt.

Durch solche Strategien, die Immunantwort zu verstärken, konnte in publizierten Studien auf Wiederholungsimpfungen verzichtet werden. Ob dies auch der Fall beim in der vorliegenden Arbeit getesteten Impfstoff ist, wurde nicht untersucht. Allerdings wäre die Beschränkung auf nur eine Impfung aus Kostenersparnis und aufgrund der Möglichkeit, sich bei einer einzelnen Applikation *in ovo* eines automatisierten Verfahrens zur Massenimmunisierung bedienen zu können, erstrebenswert.

5.4.3 Dosierung

Die Dosierung von Zytokin codierenden Plasmiden, welche als Adjuvantien vorgesehen waren, variierte zwischen 50 µg und 250 µg, je nach Applikationsweg und Studie (Chen et al., 2011; Hulse & Romero, 2004; Hung et al., 2010; Li et al., 2004; Ma et al., 2013; Park et al., 2009; Tang et al., 2008). Die eingesetzte Plasmidmenge ließ hierbei keine Zusammenhänge mit dem Steigerungsgrad des Immunschutzes durch das Adjuvans erkennen.

In Studien, welche sich mit der Optimierung der Dosierung von DNA-Vakzinen auseinandersetzten, wurden zwischen 25 und 200 µg DNA für die intramuskuläre Injektion empfohlen (Hsieh et al., 2010; Suarez & Schultz-Cherry, 2000; Xu et al., 2013). Im Gegensatz zum Einsatz von plasmidcodierten Adjuvantien in der vorliegenden Arbeit, wurde in diesen Studien jedoch die Wirkung von plasmidcodiertem Antigen untersucht. Für die *in-ovo*-Vakzination wurden bereits 40 bis 60 µg Antigen codierenden Plasmids als effiziente Dosis aufgeführt (Oshop et al., 2003).

5.4.4 Wahl der Adjuvantien und Impfzeitpunkt

5.4.4.1 ChIL-2

Der Nachweis von ChIL-2-mRNA war an LT 35 in der Milz aller Tiere möglich, die Detektion in der Muskulatur dagegen bei nur einem der mit VLP-gG/pcDNA-ChIL-2 geimpften Tiere. Hinsichtlich der Blutproben der Tage 7, 16, 21, 24, 29 und 31 konnte ChIL-18-RNA durchgehend in der Gruppe „VLP-gG/pcDNA-ChIL-2“ detektiert werden, sowie zu den beiden, auf die Wiederholungsimpfung folgenden Messzeitpunkten (LT 16 und 21) darüber hinaus in den beiden anderen Impfgruppen. Es traten keine Unterschiede bezüglich der Expressionsstärke zutage.

You et al. (2007) untersuchten ebenfalls die Expression von ChIL-2 nach Verabreichung des Zytokins in plasmidcodierter Form an Hühner. Nach intramuskulärer Applikation von 200 µg Plasmid im Alter von zwei Wochen konnte der Nachweis von ChIL-2-DNA in Serum, Leber, Herz, Milz, und Bursa fabricii von Tag 1 bis Tag 14 *post injectionem* durchgehend erbracht werden. An der Injektionsstelle im Muskel fiel der Nachweis von DNA sogar an Tag 25 positiv aus. Ebenfalls über den Zeitraum von Tag 1 bis Tag 14 konnte ChIL-2-mRNA im Muskelgewebe an der Injektionsstelle nachgewiesen werden, jedoch nicht mehr an Tag 19. In der vorliegenden Arbeit wurde die Detektion von ChIL-2-mRNA nach der Euthanasie und damit einmalig 21 Tage nach der letzten Injektion von pcDNA-ChIL-2 durchgeführt. Insofern können keine Vergleiche über den Verlauf der Nachweisbarkeit in den einzelnen Organen gezogen werden. Im vorliegenden Fall konnte mRNA weder in einem der untersuchten Organe noch an der Injektionsstelle nachgewiesen werden, was den Beobachtungen von You et al. entspricht. Darüber hinaus wurden bei dem vorliegenden Versuch etwas weniger als ein Drittel der Plasmidmenge verabreicht als in der zitierten Studie (60 µg gegenüber 200 µg), was eine längere Detektion ohnehin unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Die Verwendung des Immunmodulators IL-2 wurde bereits zur Verstärkung der Immunogenität von DNA-Impfstoffen im aviären Organismus untersucht. So erhöhte dieses Zytokin die Antikörperproduktion, die Proliferation lymphatischer Zellen, unter anderem führte es zu gesteigerten CD4⁺-T-Zell-Zahlen (Kumar et al., 2009; Tang et al., 2008), und zu einer generellen Verbesserung der Schutzwirkung eines IBDV-DNA-Vakzins (Li et al., 2004).

Obgleich die T-Zellen von Küken direkt nach dem Schlupf phänotypisch reif erscheinen,

machten Lowenthal et al. (1994) die Beobachtung, dass sie sich weder durch Mitogene zur Sekretion von ChIL-2, noch zur Proliferation anregen ließen. Ab Tag zwei war hingegen eine einsetzende IL-2-Produktion detektierbar. Lowenthal et al. zogen in dieser Studie Rückschlüsse auf die vorübergehende Produktion löslicher, inhibitorisch wirkender Substanzen, welche eine vorübergehende „Immun-Inkompetenz“ von Küken bedingen.

5.4.4.2 ChIL-18

Der Nachweis von ChIL-18-RNA war bis auf vereinzelte Ausnahmen in allen an LT 36 entnommenen Organproben möglich. Es konnten dabei keine Unterschiede der Expressionsstärke zwischen den Impfgruppen und nur leichte Abweichungen zwischen den verschiedenen Organen detektiert werden. Ebenso war ChIL-18-RNA in den Blutproben aller Messzeitpunkte und in allen Impfgruppen detektierbar. Die Expressionsstärke war dabei durchgehend konstant.

Die Betrachtung der ChIL-18-Expression im Verhältnis zum konstitutiv exprimierten Haushaltsgen GAPDH, einem Enzym der Glykolyse, erlaubt die Erfassung der relativen Expression und damit den Vergleich zwischen Geweben mit verschiedenem Stoffwechselverhalten (Borowska et al., 2016; De Boever et al., 2008; Li et al., 2005; Thellin et al., 1999; Yin et al., 2011). Auch dies zeigte keine Unterschiede zwischen den untersuchten Organen und der Präsenz im Blut auf.

Neben dem bereits geschilderten, fördernden Effekt von IL-18 auf die Proliferation von T-Lymphozyten, besteht eine herausragende Wirkung von ChIL-18 in der Steigerung der Produktion von INF- γ , dem Molekül, das im ELISpot-Assay als Maß für die zelluläre Immunantwort herangezogen wird. Dass kein direkter Effekt des Adjuvans mittels des ELISpot-Tests gemessen wurde, kann verschiedene Ursachen haben. So ist für die körpereigene Produktion eine kombinierte Wirkung von ChIL-18 und einem zusätzlichen Stimulans wie IL-12 oder anti-CD3 nötig (Göbel et al., 2003). Des Weiteren konnte kein Unterschied der Expressionsstärke von ChIL-18 zwischen Tieren, die das Plasmid erhalten haben und solchen, denen PBS verabreicht wurde festgestellt werden. Somit entsprachen die bestimmten ChIL-18-Niveaus vermutlich dem ohnehin vorhandenen, basalen Niveau. Gemäß einer Untersuchung von Abdul-Careem et al. (2007) setzt die konstitutive Expression dieses Interleukins in der Milz

an Embryonaltag 12 ein. Unmittelbar nach Schlupf steigt die Expressionsrate sprunghaft auf das 3,2-fache an, mit einem Höchstwert innerhalb der ersten zehn Lebenstage an Tag sieben.

5.4.5 VLP-basierte Impfstoffe – Einfluss von Applikationsart, Dosis und Zeitpunkt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung von VLPs als Vakzine gegen ILTV zur Verabreichung *in ovo* und per intramuskulärer Injektion getestet.

Obgleich umfangreiche, experimentelle Untersuchungen zur Verabreichung von VLP-basierten Impfstoffen für den Menschen und auch für Säugetiere vorgenommen wurden und diese zum Teil kommerziell erhältlich sind, findet dieser Ansatz bislang keine kommerzielle Verwendung in der Geflügelhaltung. Durch die Unterschiede der Physiologie von Säugern und Vögeln lassen sich Erkenntnisse, welche auf experimentellen Untersuchungen an Säugern basieren, nicht grundsätzlich auch auf den aviären Organismus übertragen (Liu et al., 2013).

Ein wichtiger Parameter mit Einfluss auf die Wirkung eines Vakzins kann der Applikationsweg sein. Taghavian et al. (2013) untersuchten die Verabreichung von subviralen Partikeln, welche durch spontane Zusammenlagerung des IBDV-Kapsidproteins VP2 zu 23 nm großen Teilchen entstanden und daher hinsichtlich ihrer Größe und ihres Aufbaus unbehüllten VLPs entsprechen. Sie konnten die immunogene Wirkung der Partikel im Huhn nachweisen, stellten jedoch darüber hinaus fest, dass der Grad an Schutz vor Krankheit sich je nach Applikationsroute unterschied. Während die intramuskuläre Injektion die vollständige Prävention vor Krankheitssymptomen bot, führte die orale Administration nicht zum selben Erfolg. Der Versuchszeitraum erstreckte sich von der Erstimmunisierung an LT 14 mit vier, je wöchentlichen Wiederholungsimpfungen bis zur Euthanasie an LT 49. Diese Beobachtungen bestätigen, dass der Applikationsweg mitentscheidend über die immunogene Wirkung ist. In der hier vorliegenden Arbeit wurde neben der *in-ovo*-Applikation ebenfalls die intramuskuläre Injektion untersucht.

Die Induktion einer Immunantwort beim Vogel durch Injektion von VLPs nach Schlupf wurde bereits mit Erfolg untersucht (D. Lee et al., 2011; H. Lee et al., 2015; Park et al., 2012, 2014; Shen et al., 2013). Park et al. (2014) stellten dabei allerdings fest, dass die Höhe der Antikörperproduktion durch die VLP-basierte Impfung gegen die Newcastle-Krankheit dosisabhängig ist. So konnte Schutz vor Erkrankung erst in einer VLP-Dosierung von 10 µg oder 50 µg gewährleistet werden. Diese Beobachtung stimmt mit der Untersuchung eines auf

VLPs basierenden Vakzins gegen Influenza H9N2 überein, wobei ebenfalls die proportionale Zunahme des Antikörpertiters bei Steigerung der VLP-Dosis bis 10 µg beschrieben wurde (D. Lee et al., 2011). Auch Park et al. (2012) erzielten gesteigerte Antikörpertiter durch erhöhte VLP-Impfdosen gegen Aviäre Influenza H5N1. Darüber hinaus wurden in den beiden letztgenannten Studien der Impfstoffpräparation ISA70 als Adjuvans beigefügt. Die Antikörperantwort ohne diesen Zusatz war ungeachtet der Menge der eingesetzten VLPs niedrig (D. Lee et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnten Shen et al. (2013b) mittels behüllter, chimärer VLPs gegen Aviäre Influenza und die Newcastle Krankheit mit einer VLP-Dosis von 20 µg ohne den Zusatz von Adjuvantien hohe Antikörperkonzentrationen und den Schutz vor einer Erkrankung erzielen. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht der Gesamtproteingehalt zur Quantifizierung der Impfstoffdosis herangezogen, sondern die Menge von Kapsidprotein (*gag*) und Oberflächenglykoprotein separat bestimmt. Mit Anteilen zwischen 0,5 mg und 1,6 mg *gag* bzw. zwischen 140 µg und 490 µg des Glykoproteins lag die Dosierung jedoch weit über der als Grenze zur Steigerung der Immunantwort beschriebenen Dosis von 10 µg. Somit scheint eine zu geringe VLP-Dosis als Erklärung für die niedrige Antikörperantwort in Versuch B unwahrscheinlich.

5.5 Verträglichkeit des Impfstoffes

Neben der Herstellung und Modifikation der Impfstoffkomponenten war ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Impfstoffverträglichkeit und der Immunreaktion *in vivo*.

Publikationen zur Verabreichung von VLPs in der Geflügelmedizin und zur *in-ovo*-Applikation partikulärer Substanzen im Allgemeinen sind bislang rar (Jochemsen & Jeurissen, 2002; Taghavian et al., 2013).

Die Applikation der Impfstoffe ins embryonierte Hühnerei erfolgte manuell am 18. Bebrütungstag anhand des Schemas nach Sharma & Burmester (1984), wohingegen die Adjuvantien gezielt in die Luftkammer appliziert wurden, wie für die *in-ovo*-Vakzination mit DNA beschrieben wurde (Oshop et al., 2003).

Die Applikation aller Impfstoffzubereitungen in Versuchsansatz A wurden von 100 % der Embryonen ohne Vitalitätsverlust übertragen, wie durch Schieren der Bruteier am 20. Bebrütungstag verifiziert werden konnte. Darüber hinaus konnte keine Beeinträchtigung der Schlupf- und Aufzuchtrate festgestellt werden. Der Einbruch der Schlupfrate in Versuchsansatz

B in sämtlichen geschilderten Kombinationen von Impfstoff und Adjuvans ist höchstwahrscheinlich auf genetische Defekte der Elterntiere zurückzuführen. Die Aufzucht der geschlüpften Küken in Versuch B betrug 100 %.

Bei Applikation gemäß Sharma und Burmester am 18. Bebrütungstag gelangen 11 % der injizierten Substanzen ins embryonale Gewebe und 89 % in die Amnionhöhle (Sharma, 1986; Sharma & Burmester, 1982). Von dort aus werden sie aktiv durch die an ED 17 bis 18 einsetzenden Atembewegungen durch Schnabelhöhle und Trachea in die Lunge transportiert. Des Weiteren ist die Aufnahme über die Kloake beschrieben (Negash et al., 2004). Die Aufnahme ins embryonale Gewebe findet im Respirationstrakt und über die Bursa fabricii statt. Im Gegensatz zu replikationsfähigen Vakzinen werden partikuläre Substanzen nicht zu den lymphatischen Organen transportiert und treten auch nicht in den Blutkreislauf über, sondern verbleiben an den beiden Eintrittsstellen (Jochemsen & Jeurissen, 2002). Auch wenn sich das Adsorptionsverhalten der VLPs möglicherweise von den in der geschilderten Studie verwendeten Kohle- und Polystyrolatexpartikeln unterscheidet, ist dennoch von demselben Aufnahmemechanismus durch den Embryo auszugehen. Die Verteilung und Abbaurate der injizierten VLPs im Organismus war in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht Gegenstand der Untersuchungen.

Hinsichtlich der Inokulation von DNA ins embryonierte Hühnerei wurde neben dem eingangs erwähnten Applikationsweg die Luftkammer zur Platzierung des Impfstoffs beschrieben (Haygreen et al., 2006; Oshop et al., 2003). Innerhalb von 30 Minuten nach der Applikation in die Amnionflüssigkeit wurde in diesen Studien die Degradierung der injizierten DNA beobachtet, nach zwei Stunden war keinerlei DNA mehr nachweisbar. Haygreen et al. (2006) zogen daraus Rückschlüsse auf die Präsenz einer DNase in diesem embryonalen Kompartiment. Daher untersuchten sie den Effekt, den die Applikation von DNA direkt auf die Membran der Luftkammer hat. Unabhängig von der Inokulationsroute und ungeachtet des rapiden Abbaus konnte dennoch die Expression des codierten Proteins in Thymus und Drüsenmagen, sowie in Leber und Muskulatur, bei Applikation auf die Luftkammer darüber hinaus auch in Bursa fabricii und Knochenmark nachgewiesen werden (Haygreen et al., 2006; Oshop et al., 2003). Um dem Abbau des injizierten DNA-Adjuvans vorzubeugen wurde in dieser Arbeit die Methode zur Applikation in die Luftkammer gewählt (vgl. Kapitel „Applikationsmethode und Auffrischungsimpfungen“).

Im weiteren Verlauf der Versuche am geschlüpften Küken wurden bei den Versuchsansätzen B und C an Lebenstag 14 je eine Impfstoffdosis intramuskulär in den M. iliotibialis lateralis dexter injiziert. Auch diese Applikationsroute führte zu keinerlei feststellbaren klinischen Krankheitserscheinungen. Es wurden weder lokale noch systemische Schädigungen am Tier festgestellt. Die pathologisch-anatomische Untersuchung nach Abschluss der *in-vivo*-Versuche legte keine Veränderungen an der Injektionsstelle offen. Damit ist die gute Gewebeverträglichkeit der Impfstoffzubereitung bestätigt.

Die Aufzeichnung der Gewichtsentwicklung zeigte keine Abweichungen zwischen den einzelnen Tiergruppen und der Kontrollgruppe auf, weder nach *in-ovo*-Applikation noch nach der in Versuchsansatz B und C an Lebenstag 14 durchgeführten, intramuskulären Impfung. Gewichtsabweichungen einzelner Tiere in der zweiten Hälfte der Versuche lassen sich mit Geschlechtsunterschieden der Tiere vereinbaren und sind in keinem der Fälle repräsentativ für eine gesamte Gruppe. Somit ist die Applikation der untersuchten Impfstoffpräparationen für Küken gut verträglich und führt zu keinen Beeinträchtigungen ihrer Gewichtsentwicklung.

5.6 Wirkung des Impfstoffes

Versuch A:

In Versuchsansatz A wurde die alleinige Wirkung der ILTV-Antigen präsentierenden VLPs nach Verabreichung *in ovo* getestet. Während sich hinsichtlich der Verträglichkeit des Impfstoffes keinerlei Bedenken ergaben, konnte keine Immunreaktion detektiert werden, denn nach einmaliger VLP-Inokulation ins embryonierte Hühnerei war weder eine humorale noch eine zelluläre Reaktion mittels ELISA und ELISpot messbar.

Versuch B:

Im Versuchsansatz B wurde VLP-gG zusammen mit pcDNA-ChIL-2 *in ovo* verabreicht, an LT 14 folgte eine Wiederholungsimpfung in die Muskulatur des Oberschenkels. Die Vergleichsgruppen erhielten pcDNA-ChIL-2 bzw. PBS.

Bei drei der vier mit VLP-gG/pcDNA-ChIL-2 immunisierten Tiere ließen sich geringe Mengen Glykoprotein G spezifischer Antikörper nachweisen. Bei einem Tier war diese humorale Immunreaktion bereits nach der Verabreichung *in ovo* messbar, bei zwei weiteren nach der

Wiederholungsimpfung. Somit konnte die Immunreaktion auf die Applikation von VLP-gG gegenüber Versuchsansatz A verstärkt werden. Dies kann mehrere Gründe haben: 1. eine höhere Antigen-Konzentration als in Versuch A, 2. eine Auffrischungsimpfung an LT 14, 3. einen möglicherweise unterstützenden Einfluss des plasmidcodierten ChIL-2.

Bis jetzt bleibt offen, ob oder in welchem Maß die hervorgerufene humorale Reaktion Schutz vor Infektion oder klinischen Symptomen bietet, da der vorliegende Versuchsansatz keine Infektion der Tiere mit ILTV einschloss. Ebenso kann anhand der in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Vakzinationen keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Abfall des Antikörpertiters innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 36 Tagen zurück auf das Basalniveau ebenfalls einen Rückschluss auf den Rückgang der Schutzwirkung aufzeigt.

Versuch C:

In Versuch C wurde der Fokus auf die zelluläre Immunantwort gerichtet, da diese für einen effizienten Schutz gegen eine ILTV-Infektion ausschlaggebend ist. Es wurden zwei Methoden zu deren Verstärkung angewandt: Sowohl die Maleylierung von potentiellen Antigenen als auch IL-18 tragen zur Induktion vorwiegend zellulärer Abwehrmechanismen bei. Daher wurden in Versuchsansatz C die ILTV-Antigen präsentierenden VLPs maleyliert und plasmidcodiertes Hühner-IL-18 (pcDNA-ChIL-18) an LT 14 appliziert. Die Vergleichsgruppen erhielten pcDNA-ChIL-18 bzw. PBS.

In diesem Versuchsansatz wurde auf die vorangehende *in-ovo*-Applikation des Impfstoffes verzichtet, da bislang noch keine zelluläre Immunantwort nach der Vakzinierung ins embryonierte Hühnerei beschrieben wurde und im vorangegangenen Versuch (Versuch A) auch keine zelluläre Immunantwort gemessen werden konnte. Im Alter von 14 Tagen hingegen ist die Migration der T-Lymphozyten in die peripheren, lymphatischen Organe weitestgehend abgeschlossen und für die Stimulation durch Antigene prinzipiell empfänglich.

Im Zuge der experimentellen Vakzinationen *in vivo* ließ sich die konstante Expression von ChIL-18 sowohl im überwiegenden Anteil der untersuchten Organe von LT 36, als auch anhand der regelmäßig entnommenen Blutproben im Verlauf des Versuches nachweisen, jedoch gab es keine Unterschiede zwischen vakzinierten Tieren und der Kontrollgruppe. Somit scheint das nachgewiesene ChIL-18 auf eine basale Expression zurückzuführen zu sein. Es konnte keine

zelluläre Immunreaktion nachgewiesen werden. Weder durch die Messung aktivierter T-Lymphozyten mittels ELISpot-Assay, noch durch die Bestimmung des Verhältnisses zwischen $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Lymphozyten. Auch der Nachweis von Antikörpern gegen ILTV verlief negativ.

5.6.1 Die zelluläre Immunreaktion – FACS

Zur Beurteilung der T-Zell-vermittelten Immunantwort wurden in Versuchsansatz C durchflusszytometrische Analysen von mononukleären Zellen des peripheren Blutes durchgeführt und dabei die Anteile von $CD3^+CD4^+$ - und $CD3^+CD8^+$ -T-Zellen bestimmt.

Es wurde bei der mit mVLP-gB/pcDNA-ChIL-18 vakzinierten Gruppe eine tendenzielle Verschiebung des $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten zugunsten der $CD8^+$ -T-Zellen beobachtet. Dies weist auf eine Verstärkung der zytotoxischen T-Zell-Reaktionen hin.

Was bei den Messungen auffiel, war das Auftreten zweier verschiedener Populationen von $CD8^+$ -T-Zellen (schwach und intensiv). Dies wurde bereits beschrieben (Beirão et al., 2012; Bridle et al., 2006) und ist auf das Auftreten von CD8 als Homo- ($\alpha\alpha$) oder Heterodimer ($\alpha\beta$) zurückzuführen. Im Menschen werden $CD8\alpha\beta$ -Heterodimere ausschliesslich auf $TCR\alpha\beta$ -T-Zellen exprimiert wohingegen $CD8\alpha\alpha$ -Homodimere auf $TCR\alpha\beta$ -, $TCR\gamma\delta$ -T-Zellen und auf einigen natürlichen Killerzellen exprimiert werden. Die Bestimmung von $CD8^+$ -T-Zellen erfolgte in diesem Fall mittels eines $CD8\alpha$ -Antikörpers.

Die Anteile sowohl der $CD4^+$ - als auch der $CD8^+$ -T-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation stiegen ab dem ersten Tag der Probennahme (LT 12) graduell an: von etwa 9 % auf 18 % $CD4^+$ -T-Zellen und von rund 6 % auf 15 % $CD8^+$ -T-Zellen. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (PBS, pcDNA-ChIL-18, mVLP-gB/pcDNA-ChIL-18) beobachtet. In den meisten Studien zur Phänotypisierung von Lymphozyten des peripheren Blutes von Hühnern, wurde mit ausgewachsenen Tieren gearbeitet. Nur Beirão et al. (2012) untersuchten die Zusammensetzung im Blut von Eintagsküken, juvenilen (5 und 12 Wochen) und ausgewachsenen (60 Wochen) Tieren. In dieser Studie wurde ebenfalls ein Anstieg der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen bis zu einem Alter von 12 Wochen beschrieben (von 8 % auf 30 % $CD4^+$, von 10 % auf 40 % $CD8^+$). Die final höheren Anteile im Vergleich zu unseren Messungen lassen sich sowohl durch den längeren Messzeitraum erklären (12 Wochen gegenüber 5 Wochen) als auch durch eine andere

Hühnerlinie. Wie bereits Bridle et al. (2006) zeigen konnte, variieren nicht nur die Anteile unterschiedlicher Zelltypen, sondern auch deren Verlauf während des Alterns in unterschiedlichen Hühnerlinien. Die von uns gemessenen Werte für $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen liegen somit im Rahmen bereits publizierter Werte und deren Anstieg während des Messzeitraums spiegelt eine fortschreitende Entwicklung des Immunsystems wider.

Das Verhältnis von $CD4^+$ - zu $CD8^+$ -T-Zellen gilt als ein Maß für die Immunkompetenz und ist im Gegensatz zu den Anteilen der einzelnen T-Zell-Subpopulationen während der Entwicklung relativ konstant. Allerdings treten auch dabei massive Unterschiede zwischen verschiedenen Hühnerlinien auf, was auf eine auf optimale Produktionsparameter (Gewichtszunahme, Legeleistung) ausgerichtete Zucht zurückzuführen sein kann (Beilharz, 1998; Beirão et al., 2012). Die intensive Selektion auf Leistungsmerkmale zulasten der Immunkompetenz der Tiere manifestiert sich genetisch im MHC-Haplotyp (Hala et al., 1991). Als weiteren Grund für niedrige $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten bei SPF-Tieren und bei Haltung unter kontrollierten Bedingungen wird die damit ausbleibende Stimulation des Immunsystems angeführt (Bridle et al., 2006).

Das Mittel der $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten in Versuch C beträgt zwischen 1,31 und 1,63 (PBS), zwischen 0,98 und 1,48 (pcDNA-ChIL-18), sowie zwischen 0,88 und 1,82 (mVLP-gB/pcDNA-ChIL-18). Diese Werte liegen zwischen den beschriebenen Quotienten von SPF-Tieren, welche zwischen 0,74 und 0,94 lagen (Beirão et al., 2012), und den publizierten Werten (1,2 - 3,25) für Tiere, die unter nicht spezifizierten Bedingungen gehalten wurden (Bridle et al., 2006; Chen et al., 2011). Zwar wurden diese Resultate in adulten Tieren gewonnen, jedoch wurde der Quotient der $CD4^+/CD8^+$ -T-Zellen in verschiedenen Altersstufen als stabil erachtet. Dies traf in den hier untersuchten Kontrolltieren (PBS, pcDNA-ChIL-18) auch zu, allerdings verschob sich das Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ bei den vakzinierten Tieren nach erfolgter Immunisierung zugunsten der $CD8^+$ -T-Zellen. Diese Verringerung steht im Gegensatz zu einer Vakzinationsstudie gegen ILT von Chen et al. (2011). Die Impfung von Eintagsküken mit einem rekombinanten, ILTV-gB und ChIL-18 exprimierenden FPV-Vektor resultierte dabei in erhöhten $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten. Dies wurden zusammen mit einer verstärkten Proliferation von Immunzellen als eine erhöhte zelluläre Immunantwort gedeutet und für den nachgewiesenen, schützenden Effekt verantwortlich gemacht. In einer Studie zur Untersuchung von Impfstoffen gegen die Newcastle-Krankheit, wurde wiederum das Gegenteil gezeigt (Taebipur et al., 2017). Hier kam es zu einer Verringerung des $CD4^+/CD8^+$ -Quotienten nach erfolgter Impfung. Und auch hier wird argumentiert, dass dies ein Beleg für die stimulierte,

zelluläre Immunreaktion und somit maßgeblich für den Impfschutz sei. Dies erscheint insofern plausibel, da es die $CD8^+$ -T-Zellen sind, die virusinfizierte Zellen eliminieren, wohingegen $CD4^+$ -T-Zellen einen eher regulatorischen Effekt ausüben.

Eine abschliessende Aussage über einen möglichen Impfschutz wird nur ein Provokationsversuch (Infektionsversuch) liefern können.

5.7 Ausbleibende oder geringe Immunantwort

Mögliche Gründe für das Ausbleiben einer Immunantwort nach alleiniger *in-ovo*-Applikation des Impfstoffes in Versuch A könnten 1. in der mangelhaften Erkennung des Vakzins durch das Immunsystem aufgrund verfrühten Abbaus der VLPs nach *in-ovo*-Applikation oder 2. in der fehlenden Funktionalität des embryonalen Immunsystems zu suchen sein oder 3. einer zu geringen Dosis der VLPs geschuldet sein.

5.7.1 Aktivierung des Immunsystems durch das Vakzin

Das hauptsächliche Anwendungsgebiet der automatisierten, kommerziellen Nutzung der *in-ovo*-Vakzinierung besteht in der Verabreichung attenuierter Lebendimpfstoffe. Auch die Verabreichung von Vektorvakzinen mittels Inokulation ins Brutei kann zur Induktion von Schutzmechanismen gegen Infektionen führen. Dagegen wurde die Applikation unbelebter, nicht replikationsfähiger Impfstoffe, welche auch nicht – wie DNA-Vakzine – vom Wirtsorganismus exprimiert und dem Organismus daher über einen gewissen Zeitraum als Antigene präsentiert werden, nur wenig erforscht.

Wie bereits geschildert (vgl. Kapitel „VLP-basierte Impfstoffe – Einfluss von Applikationsart, Dosis und Zeitpunkt“), ist die prinzipielle Aufnahme partikulärer, unbelebter Substanzen nach Vakzination an Embryonaltag 18 ins Hühnerei möglich. Allerdings ist die Verteilung im Embryo gegenüber replikationsfähigen Impfstoffen eingeschränkt.

Ungeachtet der tatsächlichen Verteilung im Organismus konnte jedoch die immunogene Wirkung solcher Substanzen belegt werden: Eine Studie von Godlewska et al. (2016) beschäftigte sich mit der *in-ovo*-Verabreichung sogenannter Outer Membrane Vesicles (OMV, Vesikeln der äußeren Membran), in welche Antigene von *Campylobacter jejuni* eingelagert

sind. Dabei wurde eine Verminderung der intestinalen Bakterienzahl und eine verstärkte Bildung von Antikörpern festgestellt. Kapczynski et al. (2012) untersuchten Antikörper-Antigen-Komplexe (AAC, Antibody Antigen Complexes) gegen die Newcastle-Krankheit, welche *in ovo* appliziert wurden und ihr immunogenes Potential erst nach Abklingen der Wirkung von maternalen Antikörpern entfalteten. Nach experimenteller Infektion an LT 14 vermochte dieses Vorgehen vor Krankheitssymptomen zu schützen. Obgleich sich die in beiden Studien eingesetzten Substanzen von den VLPs der gegenwärtigen Arbeit unterscheiden und daher keine Vergleiche hinsichtlich der Persistenz des Impfstoffes im Wirt erlauben, belegen sie dennoch, dass der Erfolg nach einmaliger Immunisierung *in ovo* nicht ausschließlich von der Vermehrung der Impfsubstanz im Körper abhängt. Speziell im Fall der AAC ist jedoch die Fähigkeit, über einen gewissen Zeitraum dem Abbau im Wirtsorganismus zu entgehen, entscheidendes Kriterium für ihre Wirkungsweise. Dem entgegen wird in der Studie von Godlewska et al. explizit darauf hingewiesen, dass die erzielte Schutzwirkung nicht nachhaltig sei und daher eine Wiederholungsimpfung nach Schlupf zur Verbesserung des Impfschutzes erwogen werde. Dieser Ansatz wurde auch in der vorliegenden Arbeit in Versuch B verfolgt.

5.7.2 Funktionelle Reife des Immunsystems

Die geschilderten Beobachtungen – das Ausbleiben einer Immunantwort in Versuch A, sowie die geringe Antikörpermenge und der rasche Abfall des Antikörperspiegels nach *in-ovo*-Vakzination in Versuch B – lassen sich mit der Ontogenese des aviären Immunsystems in Übereinstimmung bringen. Diese setzt zwar früh in der embryonalen Entwicklung ein, die vollständige Reife in Hinsicht auf die Funktionalität des Immunsystems ist allerdings erst zu einem späteren Zeitpunkt gewährleistet.

Zwar kann eine antikörperbasierte Immunantwort schon an ED 12 bis 14 hervorgerufen werden (Sharma, 1991), jedoch verlassen reife B-Lymphozyten die Bursa fabricii erst etwa drei Tage vor dem Schlupf und wandern zu den peripheren, lymphatischen Organen aus. So wird die vollständige Immunkompetenz, welche für die aktive Immunisierung durch ein Vakzin notwendig ist, erst einige Tage nach dem Schlupf erlangt (Mast & Goddeeris, 1999). Die Synthese von Immunglobulinen beginnt erst ab der zweiten Lebenswoche und erst mit Ende des ersten Lebensmonats entsprechen die IgM-, IgY- und IgA-Werte jenen adulter Tiere.

Die Reifung und Entwicklung der T-Lymphozyten verläuft in je drei Wellen. Embryonale Vorläuferzellen besiedeln den Thymus zwischen ED 7, ED 12 und 14, sowie zwischen ED 18 und 21. Nach ihrer Reifung schließt sich die Auswanderung in die peripheren, lymphatischen

Organe, beginnend an ED 15, je etwa 14 Tage auf die Einwanderung folgend an. (Sharma, 1991; Vainio & Inhof, 1995). Eine Studie von Peters et al. (2003) verweist darüber hinaus auf die Beobachtung, dass die Stimulation mit der mitogen wirkenden Kombination Ionomycin/PMA erst mit zunehmendem Alter des Embryos und insbesondere nach Schlupf zu einer gesteigerten Proliferation der Thymozyten führt. Der Effekt auf die Zytokinsynthese im frühen Embryonalstadium ist der Reaktion nach Schlupf sogar gänzlich entgegengesetzt.

5.7.3 Impfstoffdosis

Ein weiterer Aspekt betrifft die Wirkstoffdosierung. Für die Verabreichung von VLPs an Vögel wurden Dosierungen zwischen 10 µg oder 50 µg als erfolgreich zur Etablierung eines schützenden Immunstatus beschrieben. Für DNA-Vakzine und Adjuvantien in Form von plasmidcodierten Zytokinen wurden Konzentrationen zwischen 25 µg und 250 µg empfohlen und bei der Verabreichung von DNA ins embryonierte Hühnerei auf Mengen zwischen 40 µg bis 60 µg verwiesen (vgl. Kapitel „Dosierung“ und „VLP-basierte Impfstoffe – Einfluss von Applikationsart, Dosis und Zeitpunkt“). Jedoch lässt insbesondere die Quantifizierung der VLPs keine zwingenden Rückschlüsse zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen zu, da sich der Aufbau der Partikel jeweils unterscheidet und die Immunogenität ihrer einzelnen Komponenten wie auch deren synergistische Wirkung auf das Immunsystem schwer bestimmt werden kann.

Desgleichen lassen sich auch Dosierungen und Protokolle von Hühnern in juvenilem oder adultem Stadium nicht direkt auf die Vakzination *in ovo* anwenden.

5.7.4 Zeitpunkt der Probennahme

Das negative Resultat bezüglich der fehlenden bzw. niedrigen Immunantwort bei der Bestimmung der INF- γ -Produktion mittels ELISpot-Assay kann neben der fehlenden Stimulation des Immunsystems durch den Impfstoff auch auf die Wahl des Messzeitpunktes zurückgeführt werden. Gegenüber publizierten Messungen waren die Zeitintervalle zwischen Antigenexposition und Bestimmung der Immunreaktion in den hier beschriebenen Versuchsansätzen relativ lang. Denn hierfür bedarf es Splenozyten, was eine mehrmalige Probennahme vom selben Tier ausschließt. Somit konnte die Immunreaktion nicht im Zeitverlauf verfolgt werden.

In Versuchsansatz A wurde der INF- γ Nachweis mittels ELISpot-Test 14 bzw. 42 Tage nach der Impfung, in Versuchsansatz C 21 Tage nach letztmaliger Impfung angewandt.

Dem gegenüber entwickelten Ariaans et al. (2008) einen ELISpot-Test für aviäre T-Zell-Antworten und erprobten seine Funktionalität anhand von Milzzellen 17 Tage nach Impfung gegen die Newcastle-Krankheit mit einem kommerziell erhältlichen Vakzin. Im selben Zeitfenster bewegte sich die Gewinnung von Milzzellen in Studien von Wu et al. (1998), sieben und 14 Tage nach experimenteller Infektion mit IBDV und vorangegangener Impfung, und von Boyd et al. (2013), welche die Zellen zwischen zehn und 15 Tagen nach letztmaliger Impfung isolierten.

5.8 Schlussfolgerung

In den Versuchen zur *in-vivo*-Applikation wurde festgestellt, dass die Verabreichung der VLPs, bzw. der kombinierten Applikation von VLPs und ChIL-DNA *in ovo* weder zu Unverträglichkeitsreaktionen führt noch die Vitalität oder den Schlupf der Küken beeinträchtigt. Die intramuskuläre Injektion zog ebenfalls keinerlei lokale Gewebsschädigungen oder systemischen Krankheitssymptome nach sich.

Die Applikation *in ovo* gefolgt von einer Wiederholungsimpfung nach Schlupf führte zur Etablierung einer Immunantwort mittels antikörperbasierter Mechanismen nach Impfung mit VLP-gG, jedoch nicht zur Nachweisbarkeit einer Immunreaktion nach einmaliger Applikation der VLPs *in ovo* ohne Zusatz von Adjuvantien oder anderer Modifikationen des Impfstoffes.

Es ist denkbar, dass das Fehlen einer messbaren Immunreaktion in einer zu geringen Impfstoffdosierung begründet liegt oder der Unreife des Immunsystems während der Zeit der VLP-Präsenz im Brutei geschuldet ist und sich dies entweder durch völliges Ausbleiben einer Antwort äußert oder dass durch deren kurze Dauer etwa die Detektion mittels ELISpot verhindert wird, da die Probennahme hierfür ausschließlich an LT 14, 36 und 42 möglich war.

Zusammenfassend muss konstatiert werden, dass der Nachweis zellulärer Immunreaktionen auf die Verabreichung von mVLP-gB/pcDNA-ChIL-18 negativ ausfiel. Da die Analyse der T-Lymphozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie ein antigenunspezifischer Weg zur Detektion ist, welcher durch jegliche, als körperfremd erkannte Substanz angesprochen werden sollte, drängt sich vordergründig die Infragestellung der Dosierung und der Applikationsmethode und nicht zwingend der prinzipiellen Zusammensetzung des Impfstoffes auf.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdul-Careem, M. F., Hunter, D. B., Lambourne, M. D., Barta, J., & Sharif, S. (2007). Ontogeny of Cytokine Gene Expression in the Chicken Spleen. *Poult Sci*, 86, 1351–1355.
- Abraham, R., Singh, N., Mukhopadhyay, A., Basu, S. K., Bal, V., & Rath, S. (1995). Modulation of immunogenicity and antigenicity of proteins by maleylation to target scavenger receptors on macrophages. *J Immunol*, 154, 1–8.
- Agnew-Crumpton, R., Vaz, P. K., Devlin, J. M., Rourke, D. O., Blacker-Smith, H. P., Konsak-Ilievski, B., Noormohammadi, A. H. (2016). Spread of the newly emerging infectious laryngotracheitis viruses in Australia. *Infect Genet Evol*, 43, 67–73. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.023>
- Ahn, H. J., Maruo, S., Tomura, M., Mu, J., Hamaoka, T., Nakanishi, K., Fujiwara, H. (1997). A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol*, 159, 2125–2131.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiweger, T., Fujita, H., Gomez, E., Zeller, S. (2011). Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 127(3), 701–721. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050>
- Akhtar, J., & Shukla, D. (2009). Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J.*, 276(24), 7228–7236. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07402.x>.23.05.2017
- Alcami, A. (2003). Viral Mimicry of Cytokines, Chemokines and their Receptors. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 36–50. <http://doi.org/10.1038/nri980>
- Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Arai, N., & Yokota, T. (1990). Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 783–836.
- Ariaans, M. P., Haar, P. M. Van De, Lowenthal, J. W., Eden, W. Van, Hensen, E. J., & Vervelde, L. (2008). ELISPOT and intracellular cytokine staining: Novel assays for quantifying T cell

- responses in the chicken. *Dev Comp Immunol*, 32, 1398–1404.
<http://doi.org/10.1016/j.dci.2008.05.007>
- Asif, M., Jenkins, K. A., Hilton, L. S., Kimpton, W. G., Bean, A. G. D., & Lowenthal, J. W. (2004). Cytokines as adjuvants for avian vaccines. *Immunol. Cell Biol*, 82, 638–643.
<http://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01295.x>
- Awasthi, S., Lubinski, J. M., & Friedman, H. M. (2009). Immunization with HSV-1 glycoprotein C prevents immune evasion from complement and enhances the efficacy of an HSV-1 glycoprotein D subunit vaccine. *Vaccine*, 27(49), 6845–6853.
<http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.017>
- Bachmann, M. F., & Jennings, G. T. (2010). Vaccine delivery : a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.*, 10(11), 787–796. <http://doi.org/10.1038/nri2868>
- Bachmann, M. F., & Oxenius, A. (2007). Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Reports*, 8(12), 1142–1148.
<http://doi.org/10.1038/sj.embor.7401099>
- Bagust, T. J. (1986). Laryngotracheitis (gallid-1) herpesvirus infection in the chicken 4. latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. *Avian Pathol*, 15(3), 581–595.
<http://doi.org/10.1080/03079458608436317>
- Barbulescu, K., Becker, C., Schlaak, J. F., Schmitt, E., Meyer zum Büschenfelde, K., & Neurath, Markus, F. (1998). Cutting Edge: IL-12 and IL-18 Differentially Regulate the Transcriptional Activity of the Human IFN- γ Promoter in Primary CD4 + T Lymphocytes. *J Immunol*, 160, 3642–3647.
- Basavarajappa, M. K., Kumar, S., Khattar, S. K., Gebreluul, G. T., Paldurai, A., & Samal, S. K. (2014). A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing infectious laryngotracheitis virus (ILTV) surface glycoprotein D protects against highly virulent ILTV and NDV challenges in chickens. *Vaccine*, 32(28), 3555–3563.
<http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.068>

- Beilharz, R. G. (1998). Environmental limit to genetic change. An alternative theorem of natural selection. *J Anim Breed Genet*, 115, 433–437.
- Beirão, B. C. B., Fávoro Jr, C., Nakao, L. S., Caron, L. F., Marques Zanata, S., & Frohlich Mercadante, A. (2012). Flow cytometric immune profiling of specific-pathogen-free chickens before and after infectious challenges. *Vet Immunol Immunopathol*, 145(1–2), 32–41. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.10.004>
- Ben-Porat, T., Veach, R. A., & Ihara, S. (1983). Localization of the Regions of Homology between the Genomes of Herpes Simplex Virus, Type 1, and Pseudorabies Virus. *Virology*, 204(127), 194–204.
- Borowska, D., Rothwell, L., Bailey, R. A., Watson, K., & Kaiser, P. (2016). Identification of stable reference genes for quantitative PCR in cells derived from chicken lymphoid organs. *Vet Immunol Immunopathol*, 170, 20–24. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.01.001>
- Bowersock, T. L., & Martin, S. (1999). Vaccine delivery to animals. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 38(1999), 167–194.
- Boyd, A. C., Ruiz-Hernandez, R., Peroval, M. Y., Carson, C., Balkissoon, D., Staines, K., ... Butter, C. (2013). Towards a universal vaccine for avian influenza: Protective efficacy of modified Vaccinia virus Ankara and Adenovirus vaccines expressing conserved influenza antigens in chickens challenged with low pathogenic avian influenza virus. *Vaccine*, 31(4), 670–675. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.11.047>
- Brandly, C. A. (1935). Some Studies of Infectious Laryngotracheitis: The Continued Propagation of the Virus upon the Chorioallantoic Membrane of the Hen's Egg. *J Infect Dis*, 57(2), 201–206.
- Bridle, B. W., Julian, R., Shewen, P. E., Vaillancourt, J.-P., & Kaushik, A. K. (2006). T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. *Can J Vet Res*, 70, 183–190.
- Bryant, N. A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., & Alcamí, A. (2003). Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding

- proteins. *EMBO*, 22(4), 833–846.
- Butler, P. J. G., & Hartley, B. S. (1972). Maleylation of Amino Groups. *Methods Enzymol*, 25, 191–199.
- Cai, W., Gu, B., & Person, S. (1988). Role of Glycoprotein B of Herpes Simplex Virus Type 1 in Viral Entry and Cell Fusion. *J Virol*, 62(8), 2596–2604.
- Cardin, A. D., & Weintraub, H. J. (1989). Molecular Modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 9, 21–32. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.9.1.21>
- Chackerian, B. (2007). Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*, 6(3), 381–390.
- Chan, M. M., Chen, C. L., Ager, L. L., & Cooper, M. D. (1988). Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J Immunol*, 140, 2133–2138.
- Chang, H. C., Lin, T. L., & Wu, C. C. (2002). DNA-mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine*, 20, 328–335.
- Chang, P., Lee, Y., Shien, J., & Shieh, H. K. (1997). Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious 1 laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *J Virol Methods*, 66, 179–186.
- Chen, H.-Y., Cui, P., Cui, B.-A., Li, H.-P., Jiao, X.-Q., Zheng, L.-L., ... Chao, A. (2011). Immune responses of chickens inoculated with a recombinant fowlpox vaccine coexpressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus and chicken IL-18. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 63, 289–295. <http://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00850.x>
- Chen, H., Yang, M., Cui, B., Cui, P., Sheng, M., Chen, G., ... Geng, J. (2010). Construction and immunogenicity of a recombinant fowlpox vaccine coexpressing S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus and chicken IL-18. *Vaccine*, 28(51), 8112–8119. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.09.106>

- Chen, H., Zhang, H., Li, X., Cui, B., Wang, S., Geng, J., & Li, K. (2011). Interleukin-18-mediated enhancement of the protective effect of an infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B plasmid DNA vaccine in chickens. *J Med Microbiol.*, 60, 110–116. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.024109-0>
- Chen, H., Zhao, L., Wei, Z., Cui, B., Wang, Z., Li, X., ... Liu, J. (2010). Enhancement of the immunogenicity of an infectious laryngotracheitis virus DNA vaccine by a bicistronic plasmid encoding glycoprotein B and interleukin-18. *Antiviral Res.*, 87(2), 235–241. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.05.009>
- Cheng, H. W., Eicher, S. D., Chen, Y., Singleton, P., & Muir, W. M. (2001). Effect of Genetic Selection for Group Productivity and Longevity on Immunological and Hematological Parameters of Chickens. *Poult Sci*, 80, 1079–1086.
- Cheshenko, N., & Herold, B. C. (2002). Glycoprotein B plays a predominant role in mediating herpes simplex virus type 2 attachment and is required for entry and cell-to-cell spread. *J. Gen. Virol.*, 83, 2247–2255.
- Chin, R. P., Garcia, M., Corsiglia, C., Riblet, S., Crespo, R., Shivaprasad, H. L., ... Franca, M. (2009). Intervention Strategies for Laryngotracheitis: Impact of Extended Downtime and Enhanced Biosecurity Auditing. *Avian Dis*, 53, 574–577.
- Collisson, E. W., Pei, J., Dzielawa, J., & Seo, S. H. (2000). Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. *Dev Comp Immunol*, 24, 187–200.
- Coppo, M. J. C., Hartley, C. A., & Devlin, J. M. (2013). Immune responses to infectious laryngotracheitis virus. *Dev Comp Immunol*, 41(3), 454–462. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.022>
- Coppo, M. J. C., Noormohammadi, A. H., Browning, G. F., Devlin, J. M., Coppo, M. J. C., Noormohammadi, A. H., & Browning, G. F. (2013). Challenges and recent advancements in infectious laryngotracheitis virus vaccines. *Avian Pathol*, 42(3), 195–205. <http://doi.org/10.1080/03079457.2013.800634>

- Coppo, M. J. C., Noormohammadi, A. H., Hartley, C. A., James, R., Browning, G. F., Devlin, J. M., ... Gilkerson, J. R. (2011). Comparative in vivo safety and efficacy of a glycoprotein G-deficient candidate vaccine strain of infectious laryngotracheitis virus delivered via eye drop. *Avian Pathol*, 40(4), 411–417. <http://doi.org/10.1080/03079457.2011.588686>
- Cover, M. S. (1996). The Early History of Infectious Laryngotracheitis. *Avian Dis*, 40(3), 494–500.
- Cox, J. C., & Coulter, A. R. (1997). Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 15(3), 248–256.
- Crawshaw, G. J., & Boycott, B. R. (1982). Infectious Laryngotracheitis in Peafowl and Pheasants. *Avian Dis*, 26(2), 397–401.
- Crisci, E., Bárcena, J., & Montoya, M. (2012). Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 148(3–4), 211–225. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.04.026>
- Cruickshank, J. G., Berry, D. M., & Hay, B. (1963). The fine Structure of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Virology*, 20(2), 376–378.
- Davison, A. J. (2010). Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*, 143(1), 52–69. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
- Davison, S., Gingerich, E. N., Casavant, S., Eckroade, R. J., Davison, S., Gingerich, E. N., ... Eckroade, R. J. (2006). Evaluation of the Efficacy of a Live Fowlpox-Vectored Infectious Laryngotracheitis/Avian Encephalomyelitis Vaccine Against ILT Viral Challenge. *Avian Dis*, 50(1), 50–54.
- De Boever, S., Vangestel, C., Backer, P. De, Croubels, S., & Sys, S. U. (2008). Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. *Vet Immunol Immunopathol*, 122, 312–317. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.12.002>
- Deml, L., Speth, C., Dierich, M. P., Wolf, H., & Wagner, R. (2005). Recombinant HIV-1 Pr55 gag

- virus-like particles : potent stimulators of innate and acquired immune responses, *42*, 259–277. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.028>
- Devlin, J. M., Browning, G. F., Hartley, C. A., & Gilkerson, J. R. (2007). Glycoprotein G deficient infectious laryngotracheitis virus is a candidate attenuated vaccine. *Vaccine*, *25*, 3561–3566. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.01.080>
- Devlin, J. M., Browning, G. F., Hartley, C. A., Kirkpatrick, N. C., Mahmoudian, A., Noormohammadi, A. H., & Gilkerson, J. R. (2006). Glycoprotein G is a virulence factor in infectious laryngotracheitis virus. *J. Gen. Virol*, *87*, 2839–2847. <http://doi.org/10.1099/vir.0.82194-0>
- Devlin, J. M., Viejo-Borbolla, A., Browning, G. F., Noormohammadi, A. H., Gilkerson, J. R., Alami, A., & Hartley, C. A. (2009). Evaluation of immunological responses to a glycoprotein G deficient candidate vaccine strain of infectious laryngotracheitis virus. *Vaccine*, *28*(5), 1325–1332. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.013>
- Dey, A. K., & Srivastava, I. K. (2011). Novel adjuvants and delivery systems for enhancing immune responses induced by immunogens. *Expert Rev. Vaccines*, *10*(2), 227–251. <http://doi.org/10.1586/erv.10.142>
- Ding, J., Qian, W., Liu, Q., & Liu, Q. (2012). Multi-epitope recombinant vaccine induces immunoprotection against mixed infection of *Eimeria* spp. *Parasitol Res*, *110*, 2297–2306. <http://doi.org/10.1007/s00436-011-2764-y>
- Ding, X., Lillehoj, H. S., Dalloul, R. A., Min, W., Sato, T., Yasuda, A., & Lillehoj, E. P. (2005). In ovo vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. *Vaccine*, *23*, 3733–3740. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.01.144>
- Dufour-Zavala, L. (2008). Epizootiology of Infectious Laryngotracheitis and Presentation of an Industry Control Program Invited Review. *Avian Dis*, *52*(1), 1–7.
- Eidgenössisches Departement des Innern. (2013). Fachinformation: *Infektiöse Laryngotracheitis der Hühner*.

Eidgenössisches Departement des Innern. (2016). *Tiergesundheitsstatistik 2016*.

Esaki, M., Godoy, A., Rosenberger, J. K., Rosenberger, S. C., Yasuda, A., & Dorsey, K. M. (2013). Protection and Antibody Response Caused by Turkey Herpesvirus Vector Newcastle Disease Vaccine. *Avian Dis*, 57(4), 750–755.

Ewald, S. J., Lien, Y., Li, L., & Johnson, L. W. (1996). B-haplotype control of CD4 / CD8 subsets and TCR Vbeta usage in chicken T lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, 53, 285–301.

Fahey, K. J., & York, J. J. (1990). The role of mucosal antibody in immunity to infectious laryngotracheitis virus in chickens. *J. Gen. Virol*, (1990), 2401–2405.

Fair, J. M., Taylor-McCabe, K. J., Shou, Y., & Marrone, B. L. (2008). Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: Individual variability and repeatability. *Vet Immunol Immunopathol*, 125, 268–273. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.05.012>

Faurez, F., Dory, D., Moigne, V. Le, & Jestin, A. (2010). Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine*, 28(23), 3388–3395.

Fehervari, Z., Yamaguchi, T., & Sakaguchi, S. (2006). The dichotomous role of IL-2 : tolerance versus immunity. *Trends Immunol*, 27(3), 2–4. <http://doi.org/10.1016/j.it.2006.01.005>

Foecking, M. K., & Hofstetter, H. (1986). Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene*, 45, 101–105.

Fuchs, W., Veits, J., Helferich, D., Granzow, H., Teifke, J. P., & Mettenleiter, T. C. (2007). Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Vet Res*, 38, 261–279.

Fuchs, W., Wiesner, D., Veits, J., Teifke, J. P., & Mettenleiter, T. C. (2005). In Vitro and In Vivo Relevance of Infectious Laryngotracheitis Virus gJ Proteins That Are Expressed from Spliced and Nonspliced mRNAs. *J Virol*, 79(2), 705–716. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.2.705>

Gaffen, S. L., & Liu, K. D. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical

- applications. *Cytokine*, 28, 109–123. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.06.010>
- Gagic, M., Hill, C. A. S., Sharma, J. M., Gagic, M., Hill, C. A. S., & Sharma, J. M. (1999). In ovo Vaccination of Specific-Pathogen-Free Chickens with Vaccines Containing Multiple Agents. *Avian Dis*, 43(2), 293–301.
- Galdiero, S., Vitiello, M., D’Isanto, M., & Falanga, A. (2008). The Identification and Characterization of Fusogenic Domains in Herpes Virus Glycoprotein B Molecules. *ChemBioChem*, 9, 758–767. <http://doi.org/10.1002/cbic.200700457>
- Gao, H., Li, K., Gao, L., Qi, X., Gao, Y., Qin, L., Wang, X. (2013). DNA prime–protein boost vaccination enhances protective immunity against infectious bursal disease virus in chickens. *Vet Microbiol*, 164(1–2), 9–17. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.027>
- Garcea, R. L., & Gissmann, L. (2004). Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr Opin Biotechnol*, 15, 513–517. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.10.002>
- García, A., & de Sanctis, J. B. (2013). An overview of adjuvant formulations and delivery systems. *APMIS*, (3), 257–267. <http://doi.org/10.1111/apm.12143>
- García, M. (2017). Current and future vaccines and vaccination strategies against infectious laryngotracheitis (ILT) respiratory disease of poultry. *Vet Microbiol*, 206, 157–162. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.023>
- Garland, S. M., Steben, M., Hernandez-Avila, M., Koutsky, L. A., Wheeler, C. M., Perez, G., Railkar, R. (2007). Noninferiority of Antibody Response to Human Papillomavirus Type 16 in Subjects Vaccinated with Monovalent and Quadrivalent L1 Virus-Like Particle Vaccines. *Clin Vaccine Immunol*, 14(6), 792–795. <http://doi.org/10.1128/CVI.00478-06>
- Gelenczei, E. F., & Marty, E. W. (1964). Studies on a Tissue-Culture-Modified Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Dis*, 8(1), 105–122.
- Giansanti, F., Giardi, M. F., & Botti, D. (2006). Avian Cytokines - An Overview. *Curr. Pharm. Des*,

- 12, 3083–3099. <http://doi.org/10.2174/138161206777947542>
- Gibson, M. S., Kaiser, P., & Fife, M. (2014). The chicken IL-1 family: evolution in the context of the studied vertebrate lineage. *Immunogenetics*, 66, 427–438. <http://doi.org/10.1007/s00251-014-0780-7>
- Gildersleeve, R. P., Hoyle, C. M., Miles, A. M., Murray, D. L., Ricks, C. A., Secrest, M. N., Womack, C. L. (1993). Developmental performance of an egg injection machine for administration of Marek's disease vaccine. *J Appl Poultry Res*, 2, 337–346.
- Gimeno, I. M., Cortes, A. L., Guy, J. S., Turpin, E., Gimeno, I. M., Cortes, A. L., Turpin, E. (2011). Replication of recombinant herpesvirus of turkey expressing genes of infectious laryngotracheitis virus in specific pathogen free and broiler chickens following in ovo and subcutaneous vaccination. *Avian Pathol*, 40(4), 395–403. <http://doi.org/10.1080/03079457.2011.588196>
- Göbel, T. W., Schneider, K., Schaerer, B., Puehler, F., Weigend, S., & Stacheli, P. (2003). IL-18 Stimulates the Proliferation and IFN- γ Release of CD4+ T Cells in the Chicken: Conservation of a Th1-Like System in a Nonmammalian Species. *J Immunol*, 171, 1809–1815. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1809>
- Godlewska, R., Kuczkowski, M., Wyszynska, A., Klim, J., Derlatka, K., Wouniak-Biel, A., & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2016). Evaluation of a protective effect of in ovo delivered *Campylobacter jejuni* OMVs. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 8855–8864. <http://doi.org/10.1007/s00253-016-7699-x>
- Gong, Q., Qu, N., Niu, M., Qin, C., Cheng, M., Sun, X., & Zhang, A. (2013). Immune responses and protective efficacy of a novel DNA vaccine encoding outer membrane protein of avian *Pasteurella multocida*. *Vet Immunol Immunopathol*, 152(3–4), 317–324. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.01.001>
- Graham, D. A., McLaren, I. E., Calvert, V., Torrens, D., & Meehan, B. M. (2000). RFLP analysis of recent Northern Ireland isolates of infectious laryngotracheitis virus: Comparison with vaccine virus and field isolates from England, Scotland and the Republic of Ireland. *Avian*

- Pathol*, 29, 57–62. <http://doi.org/10.1080/03079450094298>
- Granzow, H., Klupp, B. G., Fuchs, W., Veits, J., Osterrieder, N., & Mettenleiter, T. C. (2001). Egress of Alphaherpesviruses: Comparative Ultrastructural Study. *J Virol*, 75(8), 3675–3684. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3675>
- Grgacic, E. V. L., & Anderson, D. A. (2006). Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods*, 40, 60–65. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.018>
- Griffin, A. M. (1991). The nucleotide sequence of the glycoprotein gB gene of infectious laryngotracheitis virus : analysis and evolutionary relationship to the homologous gene from other herpesviruses. *J. Gen. Virol*, 72, 393–398.
- Gu, J., Ruan, X., Huang, Z., Chen, J., & Zhou, J. (2010). Identification of functional domains of chicken Interleukin 2. *Vet Immunol Immunopathol*, 134(3–4), 230–238. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.021>
- Guo, P., Thomas, J. D., Bruce, M. P., Hinton, T. M., Bean, A. G. D., & Lowenthal, J. W. (2013). The chicken TH1 response : Potential therapeutic applications of ChIFN-gamma. *Dev Comp Immunol*, 41(3), 389–396. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2013.05.009>
- Guy, J. S., Barnes, H. J., & Smith, L. (1991). Increased Virulence of Modified-Live Infectious Laryngotracheitis Vaccine Virus Following Bird-to-Bird Passage. *Avian Dis*, 35(2), 348–355.
- Habeeb, A. F. S. A. (1966). Determination of Free Amino Groups in Proteins by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Anal Biochem*, 14(3), 328–336.
- Hadravova, R., de Marco, A., Ulbrich, P., Stokrova, J., Dolezal, M., Pichova, I., Rumlova, M. (2011). In Vitro Assembly of Virus-Like Particles of a Gammaretrovirus, the Murine Leukemia Virus XMRV. *J Virol*, 1297–1306. <http://doi.org/10.1128/JVI.05564-11>
- Haffar, O., Garrigues, J., Travis, B., Moran, P., Zarling, J., & Hu, S. (1990). Human Immunodeficiency Virus-Like, Nonreplicating , gag-env Particles Assemble in a Recombinant Vaccinia Virus Expression System. *Virology*, 64(6), 2653–2659.

- Hala, K., Vainio, O., Plachy, J., & Böck, G. (1991). Chicken major histocompatibility complex congenic lines differ in the percentages of lymphocytes bearing CD4 and CD8 antigens. *Anim Genet*, 22(3), 279–284.
- Haygreen, E. A., Kaiser, P., Burgess, S. C., & Davison, T. F. (2006). In ovo DNA immunisation followed by a recombinant fowlpox boost is fully protective to challenge with virulent IBDV. *Vaccine*, 24, 4951–4961. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.03.060>
- He, H., MacKinnon, K. M., Genovese, K. J., Nerren, J. R., Swaggerty, C. L., Nisbet, D. J., & Kogut, M. H. (2009). Chicken scavenger receptors and their ligand-induced cellular immune responses. *Molecular Immunology*, 46, 2218–2225. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.04.020>
- Helferich, D., Veits, J., Teifke, J. P., & Mettenleiter, T. C. (2007). The UL47 gene of avian infectious laryngotracheitis virus is not essential for in vitro replication but is relevant for virulence in chickens. *J. Gen. Virol*, 88, 732–742. <http://doi.org/10.1099/vir.0.82533-0>
- Herold, B. C., Visalli, R. J., Susmarski, N., Brandt, C. R., & Spear, P. G. (1994). Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J. Gen. Virol*, 75, 1211–1222.
- Hilton, L. S., Bean, A. G. D., & Lowenthal, J. W. (2002). The emerging role of avian cytokines as immunotherapeutics and vaccine adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol*, 85, 119–128.
- Hsieh, M. K., Wu, C. C., & Lin, T. L. (2010). DNA-mediated vaccination conferring protection against infectious bursal disease in broiler chickens in the presence of maternal antibody. *Vaccine*, 28(23), 3936–3943. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.066>
- Hughes, C. S., Williams, R. A., Gaskell, R. M., Jordan, F. T. W., Bradbury, J. M., Bennett, M., & Jones, R. C. (1991). Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. *Arch Virol*, 121, 213–218.
- Hulse, D. J., & Romero, C. H. (2004). Partial protection against infectious bursal disease virus through DNA-mediated vaccination with the VP2 capsid protein and chicken IL-2 genes.

- Vaccine*, 22, 1249–1259. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.09.021>
- Hung, L., Li, H., Lien, Y., Wu, M., & Chaung, H. (2010). Adjuvant effects of chicken interleukin-18 in avian Newcastle disease vaccine. *Vaccine*, 28(5), 1148–1155. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.042>
- Hunt, H. D., Lupiani, B., Miller, M. M., Gimeno, I., Lee, L. F., & Parcells, M. S. (2001). Marek's Disease Virus Down-Regulates Surface Expression of MHC (B Complex) Class I (BF) Glycoproteins during Active but not Latent Infection of Chicken Cells. *Virology*, 282, 198–205. <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0797>
- Islam, A. F. M. F., Walkden-Brown, S. W., Wong, C. W., Groves, P. J., Burgess, S. K., Arzey, K. E., & Young, P. L. (2001). Influence of vaccine deposition site on post-vaccinal viraemia and vaccine efficacy in broiler chickens following in ovo vaccination against Marek's disease. *Avian Pathology*, 30(5), 525–533. <http://doi.org/10.1080/03079450120078725>
- Jarosinski, K. W., Margulis, N. G., Kamil, J. P., Spatz, S. J., Nair, V. K., & Osterrieder, N. (2007). Horizontal Transmission of Marek's Disease Virus Requires US2, the UL13 Protein Kinase, and gC. *J Virology*, 81(19), 10575–10587. <http://doi.org/10.1128/JVI.01065-07>
- Jeong, H., & Seong, B. L. (2017). Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections. *J Microbiology*, 55(3), 220–230. <http://doi.org/10.1007/s12275-017-7058-3>
- Jiang, Y., Yu, K., Zhang, H., Zhang, P., Li, C., Tian, G., Chen, H. (2007). Enhanced protective efficacy of H5 subtype avian influenza DNA vaccine with codon optimized HA gene in a pCAGGS plasmid vector. *Antiviral Research*, 75, 234–241. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.03.009>
- Jochimsen, P., & Jeurissen, S. H. M. (2002). The Localization and Uptake of In Ovo Injected Soluble and Particulate Substances in the Chicken. *Poult. Sci.*, 81, 1811–1817.
- Johnson, D. I., Vagnozzi, A., Dorea, F., Riblet, S. M., Mundt, A., Zavala, G., & García, M. (2010). Protection against infectious laryngotracheitis by in ovo vaccination with commercially

- available viral vector recombinant vaccines. *Avian Dis*, 54(4), 1251–1259.
<http://doi.org/10.1637/9552-940110-DIGEST.1>
- Johnson, M. A., Prideaux, C. T., Kongsuwan, K., Sheppard, M., Fahey, K. J., & Health, A. (1991). Gallid herpesvirus 1 (infectious laryngotracheitis virus): cloning and physical maps of the SA-2 strain. *Arch Virol*, 119, 181–198.
- Jordan, F. T. W. (1966). A Review of the Literature on Infectious Laryngotracheitis (ILT). *Avian Dis*, 10(1), 1–26.
- Juul-Madsen, H. R., Nielsen, O. L., Krogh-Maibom, T., Røntved, C. M., Dalgaard, T. S., Bumstead, N., & Jørgensen, P. H. (2002). Major Histocompatibility Complex-Linked Immune Response of Young Chickens Vaccinated with an Attenuated Live Infectious Bursal Disease Virus Vaccine Followed by an Infection. *Poult Sci*, 81, 649–656.
- Kaiser, P. (2010). Advances in avian immunology — prospects for disease control: a review. *Avian Pathol*, 39(5), 309–324. <http://doi.org/10.1080/03079457.2010.508777>
- Kaiser, P., & Mariani, P. (1999). Promoter sequence, exon:intron structure, and synteny of genetic location show that a chicken cytokine with T-cell proliferative activity is IL2 and not IL15. *Immunogenetics*, 8, 26–35.
- Kaiser, P., Poh, T. Y., Rothwell, L., Avery, S., Balu, S., Pathania, U. S., Young, J. R. (2005). A Genomic Analysis of Chicken Cytokines and Chemokines. *J Interferon Cytokine Res*, 25, 467–484.
- Kapczynski, D. R., Hilt, D. A., Shapiro, D., Sellers, H. S., Mark, W., Kapczynski, D. R., Ad, M. W. J. (2003). Protection of Chickens from Infectious Bronchitis by In Ovo and Intramuscular Vaccination with a DNA Vaccine Expressing the S1 Glycoprotein. *Avian Dis*, 47(2), 272–285.
- Kapczynski, D. R., Martin, A., Haddad, E. E., King, D. J., Kapczynski, D. R., Martin, A. E. A., A, D. J. K. (2012). Protection from Clinical Disease Against Three Highly Virulent Strains of Newcastle Disease Virus After In Ovo Application of an Antibody–Antigen Complex Vaccine in Maternal Antibody–Positive Chickens. *Avian Dis*, 56(3), 555–560.

- Kawaguchi, T., Nomura, K., Hirayama, Y., & Kitagawa, T. (1987). Establishment and Characterization of a Chicken Hepatocellular Carcinoma Cell Line, LMH. *Cancer Research*, 47, 4460–4464.
- Kingsley, D. H., Hazel, J. W., & Keeler, C. L. (1994). Identification and Characterization of the Infectious Laryngotracheitis Virus Glycoprotein C Gene. *Virology*, 203, 336–343.
- Kingsley, D. H., & Keeler, C. L. (1999). Infectious Laryngotracheitis Virus, an Alpha Herpesvirus That Does Not Interact with Cell Surface Heparan Sulfate. *Virology*, 256, 213–219.
- Kirkpatrick, N. C., Mahmoudian, A., Rourke, D. O., Noormohammadi, A. H., Kirkpatrick, N. C., Mahmoudian, A., ... A, A. H. N. (2006). Differentiation of Infectious Laryngotracheitis Virus Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphic Analysis of Polymerase Chain Reaction Products Amplified from Multiple Genes. *Avian Dis*, 50(1), 28–34.
- Kogut, M. H. (2000). Cytokines and prevention of infectious diseases in poultry: A review. *Avian Pathol*, 29(5), 395–404. <http://doi.org/10.1080/030794500750047135>
- Kogut, M. H., Rothwell, L., & Kaiser, P. (2003). Priming by recombinant chicken interleukin-2 induces selective expression of IL-8 and IL-18 mRNA in chicken heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized and nonopsonized *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Molecular Immunology*, 40, 603–610. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.08.002>
- Kogut, M., Rothwell, L., & Kaiser, P. (2002). Differential effects of age on chicken heterophil functional activation by recombinant chicken interleukin-2. *Dev Comp Immunol*, 26, 817–830.
- Kongsuwan, K., Johnson, M. A., Prideaux, C. T., & Sheppard, M. (1993). Identification of an infectious laryngotracheitis virus gene encoding an immunogenic protein with a predicted M of 32 kilodaltons. *Virus Research*, 29, 125–140.
- Kühn, J. E., Kramer, M. D., Willenbacher, W., Wieland, U., Lorentzen, E. V. A. U., & Braun, R. W. (1990). Identification of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoproteins Interacting with the Cell Surface. *J Virol*, 64(6), 2491–2497.

- Kumar, S., Ahi, Y. S., Salunkhe, S. S., Koul, M., Tiwari, A. K., Gupta, P. K., & Rai, A. (2009). Effective protection by high efficiency bicistronic DNA vaccine against infectious bursal disease virus expressing VP2 protein and chicken IL-2. *Vaccine*, 27(6), 864–869. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.11.085>
- Lawson, S., Rothwell, L., & Kaiser, P. (2000). Turkey and Chicken Interleukin-2 Cross-React in In Vitro Proliferation Assays Despite Limited Amino Acid Sequence Identity. *J Interferon Cytokine Res*, 170, 161–170.
- Lazear, E., Whitbeck, J. C., Ponce-de-Leon, M., Cairns, T. M., Willis, S. H., Zuo, Y., & Krummenacher, C. (2011). Antibody-Induced Conformational Changes in Herpes Simplex Virus Glycoprotein gD Reveal New Targets for Virus Neutralization. *J Virol*, 1563–1576. <http://doi.org/10.1128/JVI.06480-11>
- Le Deuff, R. M., Nicolas, J. L., Renault, T., & Cochenne, N. (1994). Experimental transmission of a herpes-like virus to axenic larvae of pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 14(2), 69–72.
- Le Gall-Reculé, A. G., Cherbonnel, M., Pelotte, N., Blanchard, P., Morin, Y., & Jestin, V. (2007). Importance of a Prime-Boost DNA/Protein Vaccination to Protect Chickens Against Low-Pathogenic H7 Avian Influenza Infection. *Avian Dis*, 51(1), 490–494.
- Lee, D., Park, J., Lee, Y., Song, J., Kang, S., Lee, J., Song, C. (2011). H9N2 avian influenza virus-like particle vaccine provides protective immunity and a strategy for the differentiation of infected from vaccinated animals. *Vaccine*, 29(23), 4003–4007. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.067>
- Lee, H., Kim, J., Kye, S., Seul, H., Jung, S., & Choi, K. (2015). Efficient self-assembly and protective efficacy of infectious bursal disease virus-like particles by a recombinant baculovirus co-expressing precursor polyprotein and VP4. *Virology Journal*, 12(177), 1–9. <http://doi.org/10.1186/s12985-015-0403-4>
- Lee, S., Hee, S., Kim, V. N., Wang, J. H., Jin, M., Lee, J., & Kim, S. (1999). Heterologous Gene Expression in Avian Cells: Potential as a Producer of Recombinant Proteins. *J Biomed Sci*, 6,

8–17.

- Lee, S., Markham, P. F., Coppo, M. J. C., Legione, A. R., Markham, J. F., Noormohammadi, A. H., Devlin, J. M. (2012). Attenuated Vaccines can recombine to Form Virulent Field Viruses. *Science*, 337(6091), 188. <http://doi.org/10.1126/science.1217134>
- Legione, A. R., Coppo, M. J. C., Lee, S., Noormohammadi, A. H., Hartley, C. A., Browning, G. F., Devlin, J. M. (2012). Safety and vaccine efficacy of a glycoprotein G deficient strain of infectious laryngotracheitis virus delivered in ovo. *Vaccine*, 30(50), 7193–7198. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.023>
- Leib, D. A., Bradbury, J. M., Hartley, C. A., & McCarthy, K. (1987). Genome Isomerism in Two Alphaherpesviruses: Herpesvirus saimiri-1 (Herpesvirus tamarinus) and Avian Infectious Laryngotracheitis Virus. *Arch Virol*, 1, 287–294.
- Li, J., Liang, X., Huang, Y., & Meng, S. (2004). Enhancement of the immunogenicity of DNA vaccine against infectious bursal disease virus by co-delivery with plasmid encoding chicken interleukin 2. *Virology*, 329, 89–100. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2004.07.033>
- Li, K., Gao, L., Gao, H., Qi, X., Gao, Y., Qin, L., Wang, X. (2013). Codon optimization and woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhance the immune responses of DNA vaccines against infectious bursal disease virus in chickens. *Virus Research*, 175(2), 120–127. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.04.010>
- Li, Y. P., Bang, D. D., Handberg, K. J., Jorgensen, P. H., & Zhang, M. F. (2005). Evaluation of the suitability of six host genes as internal control in real-time RT-PCR assays in chicken embryo cell cultures infected with infectious bursal disease virus. *Vet Microbiol*, 110, 155–165. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.06.014>
- Liu, F., Wu, X., Li, L., Ge, S., Liu, Z., & Wang, Z. (2013). Virus-like particles: Promising platforms with characteristics of DIVA for veterinary vaccine design. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 36(4), 343–352. <http://doi.org/10.1016/j.cimid.2013.02.002>
- Liu, G., Lv, L., Yin, L., Li, X., Luo, D., Liu, K., ... Cao, Y. (2013). Assembly and immunogenicity

- of coronavirus-like particles carrying infectious bronchitis virus M and S proteins. *Vaccine*, 31, 5524–5530. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.024>
- Loa, C. C., Lin, T. L., Wu, C. C., Bryan, T., Thacker, H. L., Hooper, T., & Schrader, D. (2001). Humoral and Cellular Immune Responses in Turkey Poults Infected with Turkey Coronavirus. *Poult Sci*, 80, 1416–1424.
- Lowenthal, J. W., Connick, T. E., McWaters, P. G., & York, J. J. (1994). Development of T cell immune responsiveness in the chicken. *Immunol Cell Biol*, 72, 115–122.
- Lowenthal, J. W., O'Neil, T. E., David, A., Strom, G., & Andrew, M. E. (1999). Cytokine therapy: a natural alternative for disease control. *Vet Immunol Immunopathol*, 72, 183–188.
- Lowenthal, J. W., York, J. J., Neil, T. E. O., Steven, R. A., Strom, D. G., & Digby, M. R. (1998). Potential use of cytokine therapy in poultry. *Vet Immunol Immunopathol*, 63(1–2), 191–198.
- Lubinski, J. M., Wang, L., Soulika, A. M., Burger, R., Wetsel, R. A., Colten, H., Friedman, H. M. (1998). Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein gC Mediates Immune Evasion In Vivo. *J Virol*, 72(10), 8257–8263.
- Ludwig, C., & Wagner, R. (2007). Virus-like particles — universal molecular toolboxes. *Curr Opin Microbiol*, 18, 537–545. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.013>
- Ma, D., Gao, M., Li, J., Ma, C., & Li, G. (2013). Construction of novel cytokine by fusion of chicken IL-2 signal peptide to mature chicken IL-15 and comparison of the adjuvant effects by DNA immunization against *Eimeria* challenge. *Vet Immunol Immunopathol*, 156(1–2), 114–120. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.09.005>
- Mahmoudian, A., Markham, P. F., Noormohammadi, A. H., Devlin, J. M., Browning, G. F., Mahmoudian, A., Browning, G. F. (2013). Differential transcription patterns in wild-type and glycoprotein G-deleted infectious laryngotracheitis viruses. *Avian Pathol*, 42(3), 253–259. <http://doi.org/10.1080/03079457.2013.780649>
- Malek, T. R., & Bayer, A. L. (2004). Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nature*

- Immunology*, 4, 665–674. <http://doi.org/10.1038/nri1435>
- Martin, M., & Resch, K. (2009). Immunologie. In *Immunologie* (pp. 111–114).
- Mast, J., & Goddeeris, B. M. (1999). Development of immunocompetence of broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathol*, 70, 245–256.
- Mayr, A., & Kaaden, O.-R. (2007). Infektiöse Laryngotracheitis (ILT) der Hühner. In *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre* (pp. 185–186).
- McGeoch, D. J., Dolan, A., & Ralph, A. C. (2000). Toward a Comprehensive Phylogeny for Mammalian and Avian Herpesviruses. *J Virol*, 74(22), 10401–10406.
- Menendez, K. R., García, M., Spatz, S., Nathaniel, L., Menendez, K. R., García, M., Tablante, N. L. (2014). Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: a review. *Avian Patho*, 43(2), 108–117. <http://doi.org/10.1080/03079457.2014.886004>
- Mettenleiter, T. C. (1994). Initiation and spread of alpha-herpesvirus infections. *Trends Microbiol*, 2(1), 2–4.
- Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus Assembly and Egress. *J Virol*, 76(4), 1537–1547. <http://doi.org/10.1128/JVI.76.4.1537>
- Meunier, M., Chemaly, M., & Dory, D. (2016). DNA vaccination of poultry: The current status in 2015. *Vaccine*, 34(2), 202–211. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.043>
- Miyazaki, J., Takaki, S., Araki, K., Tashiro, F., Tominaga, A., Takatsu, K., & Yamamura, K. (1989). Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. *Gene*, 79, 269–277.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., & Schätzl, H. (2010). Herpesviren. In *Molekulare Virologie* (3rd ed., pp. 544–609).

- Monie, A., Hung, C., Roden, R., & Wu, T.-C. (2008). CervarixTM: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics*, 2(1), 107–113.
- Moreno, A., Piccirillo, A., Mondin, A., Morandini, E., Gavazzi, L., Cordioli, P., A, P. C. (2010). Epidemic of Infectious Laryngotracheitis in Italy: Characterization of Virus Isolates by PCR–Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequence Analysis. *Avian Dis*, 54, 1172–1177.
- Murata, K., Lechmann, M., Qiao, M., Gunji, T., Alter, H. J., & Liang, T. J. (2003). Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *PNAS*, 100(11), 6753–6758.
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., & Okamura, H. (2001). Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev*, 12, 53–72.
- Neff, A. C., Sudler, C., Hoop, R. K., Neff, C., Sudler, A. C., & Hoop, R. K. (2008). Characterization of Western European Field Isolates and Vaccine Strains of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus by Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequence Analysis. *Avian Dis*, 52, 278–283.
- Negash, T., Garib, S. O. Al, & Gruys, E. (2004). Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. *Vet Q*, 26(2), 76–78. <http://doi.org/10.1080/01652176.2004.9695170>
- Niwa, H., Yamamura, K., & Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108, 193–199.
- Ogunremi, O., Pasick, J., Kobinger, G. P., Hannaman, D., Berhane, Y., Clavijo, A., & van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2013). A Single Electroporation Delivery of a DNA Vaccine Containing the Hemagglutinin Gene of Asian H5N1 Avian Influenza Virus Generated a Protective Antibody Response in Chickens against a North American Virus Strain. *Clin Vaccine Immunol*, 20(4), 491–500. <http://doi.org/10.1128/CVI.00577-12>

- Oldoni, I., & García, M. (2007). Characterization of infectious laryngotracheitis virus isolates from the US by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian Pathol*, 36(2), 167–176. <http://doi.org/10.1080/03079450701216654>
- Oshop, G. L., Elankumaran, S., Vakharia, V. N., & Heckert, R. A. (2003). In ovo delivery of DNA to the avian embryo. *Vaccine*, 21(11–12), 1275–1281.
- Osterrieder, N. (1999). Construction and characterization of an equine herpesvirus 1 glycoprotein C negative mutant. *Virus Research*, 59, 165–177.
- Ou, S., & Giambrone, J. J. (2012). Infectious Laryngotracheitis Virus in Chickens. *World J Virol*, 1(5), 142–149. <http://doi.org/10.5501/wjv.v1.i5.142>
- Paliard, X., Liu, Y., Wagner, R., Wolf, H., Baenziger, J., & Walker, C. M. (2000). Priming of Strong, Broad, and Long-Lived HIV Type 1 p55gag-Specific CD8+ Cytotoxic T Cells after Administration of a Virus-Like Particle Vaccine in Rhesus Macaques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 16(3), 273–282.
- Park, J. H., Sung, H. W., Yoon, B. Il, & Kwon, H. M. (2009). Protection of chicken against very virulent IBDV provided by in ovo priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine and the adjuvant effects of plasmid-encoded chicken interleukin-2 and interferon- γ . *J Vet Sci*, 10(2), 131–139. <http://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.2.131>
- Park, J., Lee, D., Youn, H., Kim, M., Lee, Y., Yuk, S., Song, C. (2012). Protective efficacy of crude virus-like particle vaccine against HPAI H5N1 in chickens and its application on DIVA strategy. *Influenza Other Respir Viruses*, 7(3), 340–348. <http://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2012.00396.x>
- Park, J., Lee, D., Yuk, S., Tseren-ochir, E., Kwon, J., Noh, J., Song, C. (2014). Virus-Like Particle Vaccine Confers Protection against a Lethal Newcastle Disease Virus Challenge in Chickens and Allows a Strategy of Differentiating Infected from Vaccinated Animals. *Clin Vaccine Immunol*, 21(3), 360–365. <http://doi.org/10.1128/CVI.00636-13>

- Parmentier, H. K., Kreukniet, M. B., Goeree, B., Davison, T. F., Jeurissen, S. H. M., Harmsen, E. G. M., & Nieuwland, M. G. B. (1995). Differences in distribution of lymphocyte antigens in chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 48, 155–168.
- Parry, B. C. M., Simas, J. P., Smith, V. P., Stewart, C. A., Minson, A. C., Efstathiou, S., & Alcamí, A. (2000). A Broad Spectrum Secreted Chemokine Binding Protein Encoded by a Herpesvirus. *J. Exp. Med.*, 191(3), 573–578.
- Pavlova, S. P., Veits, J., Blohm, U., Maresch, C., Mettenleiter, T. C., & Fuchs, W. (2010). In vitro and in vivo characterization of glycoprotein C-deleted infectious laryngotracheitis virus. *J. Gen. Virol.*, 91, 847–857. <http://doi.org/10.1099/vir.0.016634-0>
- Pavlova, S., Veits, J., Mettenleiter, T. C., Fuchs, W., Pavlova, S., Veits, A. B. J., Ac, W. F. (2013). Identification and Functional Analysis of Membrane Proteins gD, gE, gI, and pUS9 of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Dis*, 57, 416–426.
- Pellet, P. E., & Roizman, B. (2013). Herpesviridae. In B. N. Fields & D. M. Knipe (Eds.), *Fields Virology Vol. 2* (6th ed., pp. 1802–1822).
- Pereira, L. (1994). Function of glycoprotein B homologues of the family herpesviridae. *Infect Agents Dis*, 3(1), 9–28.
- Peters, M. A., Browning, G. F., Washington, E. A., Crabb, B. S., & Kaiser, P. (2003). Embryonic age influences the capacity for cytokine induction in chicken thymocytes. *Immunogenetics*, 110, 358–367. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01744.x>
- Plummer, E. M., & Manchester, M. (2011). Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 3, 174–196. <http://doi.org/10.1002/wnan.119>
- Pollock, K. G. J., Conacher, M., Wei, X., Alexander, J., & Brewer, J. M. (2003). Interleukin-18 plays a role in both the alum-induced T helper 2 response and the T helper 1 response induced by alum-adsorbed interleukin-12. *Immunology*, 108, 137–143.

- Portz, C., Beltrao, N., Quedi Furian, T., Bianco Junior, A., Macagnan, M., Griebeler, J., Wageck Canal, C. (2008). Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus. *Vet Microbiol*, 131, 57–64. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.029>
- Poulsen, D. J., & Keeler, C. L. (1997). Characterization of the assembly and processing of infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B. *The Journal of General Virology*, 78 (Pt 11(1997), 2945–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9367382>
- Puren, A. J., Fantuzzi, G., & Dinarello, C. A. (1999). Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1 β are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 2256–2261.
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B., & Lahn, B. T. (2010). Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. *PLoS ONE*, 5(5), 1–4. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0010611>
- Rahman, M., & Eo, S. K. (2012). Prospects and challenges of using chicken cytokines in disease prevention. *Vaccine*, 30(50), 7165–7173. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.011>
- Ricks, C. A., Avakian, A., Bryan, T., Gildersleeve, R., Haddad, E., Ilich, R., Williams, C. (1999). In ovo vaccination technology. *Adv. Vet. Med.*, 41, 495–515. [http://doi.org/10.1016/S0065-3519\(99\)80037-8](http://doi.org/10.1016/S0065-3519(99)80037-8)
- Rodríguez-Avila, A., Oldoni, I., Riblet, S., & García, M. (2008). Evaluation of the protection elicited by direct and indirect exposure to live attenuated infectious laryngotracheitis virus vaccines against a recent challenge strain from the United States. *Avian Pathol*, 37(3), 287–292. <http://doi.org/10.1080/03079450802043742>
- Samberg, Y., Cuperstein, E., Bendheim, U., & Aronovici, I. (1971). The Development of a Vaccine against Avian Infectious Laryngotracheitis IV . Immunization of Chickens with a Modified Laryngotracheitis Vaccine in the Drinking Water. *Avian Dis*, 15(2), 413–417.
- Sarma, G., Greer, A. D. W., Gildersleeve, A. R. P., & Murray, B. D. L. (1995). Field Safety and Efficacy of in ovo Administration of HVT + SB-1 Bivalent Marek's Disease Vaccine in

- Commercial Broilers. *Avian Dis*, 39(2), 211–217.
- Scheerlinck, J. Y., & Greenwood, D. L. V. (2006). Particulate delivery systems for animal vaccines. *Methods*, 40, 118–124. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.023>
- Schneider, K., Puehler, F., Baeuerle, D., Elvers, S., Staeheli, P., Kaspers, B., & Weining, K. C. (2000). cDNA Cloning of Biologically Active Chicken Interleukin-18. *J Immunol*, 883, 879–883.
- Schnitzlein, W. M., Winans, R., Ellsworth, S., & Tripathy, D. N. (1995). Generation of Thymidine Kinase-Deficient Mutants of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Virology*, 209, 304–314.
- Schweizer Tierseuchenverordnung, 13. Abschnitt: Infektiöse Laryngotracheitis der Hühner, Art. 262 – 265 (2017).
- Seto, F. (1981). Early Development of the Avian Immune System. *Poult Sci*, 60, 1981–1995.
- Shan, S., Jiang, Y., Bu, Z., Ellis, T., Zeng, X., Edwards, J., Fenwick, S. (2011). Strategies for improving the efficacy of a H6 subtype avian influenza DNA vaccine in chickens. *J Virol Met*, 173(2), 220–226. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.008>
- Sharma, J. M. (1986). Embryo Vaccination of Specific-Pathogen-Free Chickens with Infectious Bursal Disease Virus: Tissue Distribution of the Vaccine Virus and Protection of Hatched Chickens against Disease. *Avian Dis*, 30(4), 776–780.
- Sharma, J. M. (1991). Overview of the avian immune system. *Vet Immunol Immunopathol*, 30, 13–17.
- Sharma, J. M., & Burmester, B. R. (1982). Resistance of Marek's Disease at Hatching in Chickens Vaccinated as Embryos with the Turkey Herpesvirus. *Avian Dis*, 26(1), 134–149.
- Sharma, J. M., & Burmester, B. R. (1984). Disease control in avian species by embryonal vaccination. Patent Number: 4 458 630, United States Patent.

- Sharma, J. M., & Tizard, I. (1984). Avian cellular immune effector mechanisms - A review. *Avian Pathol*, 13(3), 357–376. <http://doi.org/10.1080/03079458408418541>
- Sharma, J. M., & Witter, R. L. (1983). Embryo Vaccination against Marek's Disease with Serotypes 1, 2 and 3 Vaccines Administered Singly or in Combination. *Avian Dis*, 27(2), 453–463.
- Sharma, S., Murai, F., Miyanohara, A., & Riedmann, T. F. (1997). Noninfectious virus-like particles produced by Moloney murine leukemia virus-based retrovirus packaging cells deficient in viral envelope become infectious in the presence of lipofection reagents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 10803–10808.
- Shen, H., Xue, C., Lv, L., Wang, W., Liu, Q., Liu, K., Cao, Y. (2013). Assembly and immunological properties of a bivalent virus-like particle (VLP) for avian influenza and Newcastle disease. *Virus Res*, 178(2), 430–436. <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.009>
- Shi, L., Sings, H. L., Bryan, J. T., Wang, B., Wang, Y., Mach, H., Barr, E. (2007). GARDASIL: Prophylactic Human Papillomavirus Vaccine Development – From Bench Top to Bed-side. *Clin. Pharmacol. Ther*, 81(2), 259–264. <http://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100055>
- Shi, W., Liu, Q., Zhang, J., Sun, J., & Jiang, X. (2014). Co-expression of EtMic2 protein and chicken interleukin-18 for DNA vaccine against chicken coccidiosis. *Res. Vet. Sci.*, 97(1), 64–70. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.05.001>
- Shil, N. K., Markham, P. F., Noormohammadi, A. H., Rourke, D. O., Devlin, M., Shil, N. K., A, J. M. D. (2012). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Chicken Serum Antibody to Glycoprotein G of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Dis*, 56, 509–515.
- Singh, M., & O'Hagan, D. T. (2003). Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int J Parasitol*, 33, 469–478. [http://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00053-5](http://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00053-5)
- Singh, N., Bhatia, S., Abraham, R., Sandip, K., George, A., Bal, V., & Rath, S. (1998). Modulation of T Cell Cytokine Profiles and Peptide-MHC Complex Availability In Vivo by Delivery to Scavenger Receptors via Antigen Maleylation. *J Immunol*, 160, 4869–4880.

- Spear, P. G. (1993). Entry of Alphaherpesviruses into Cells. *Virology*, 4, 167–180.
- Spear, P. G. (2004). Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol*, 6, 401–410. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00389.x>
- Spear, P. G., Eisenberg, R. J., & Cohen, G. H. (2000). Three Classes of Cell Surface Receptors for Alphaherpesvirus Entry. *Virology*, 8(2000), 1–8. <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0529>
- Spear, P. G., Manoj, S., Yoon, M., Jogger, C. R., Zago, A., & Myscofski, D. (2006). Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology*, 344, 17–24. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.016>
- Spickler, A. R., & Roth, J. A. (2003). Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. *J Vet Intern Med*, 17, 273–281.
- Stanley, A. C., & Lacy, P. (2010). Pathways for Cytokine Secretion. *Physiology*, 25, 218–229. <http://doi.org/10.1152/physiol.00017.2010>
- Stepaniak, J. A., Shuster, J. E., Hu, W., & Sundick, R. S. (1999). Production and In Vitro Characterization of Recombinant Chicken Interleukin-2. *J Interferon Cytokine Res*, 19, 515–526.
- Stow, J. L., & Murray, R. Z. (2013). Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*, 24(3), 227–239. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.04.001>
- Suarez, D. L., & Schultz-Cherry, S. (2000). The Effect of Eukaryotic Expression Vectors and Adjuvants on DNA Vaccines in Chickens Using an Avian Influenza Model. *Avian Dis*, 44(4), 861–868.
- Sun, A. H., Wang, Y., Tong, G., Zhang, P., Miao, D., Wang, M., ... B, M. W. (2008). Protection of Chickens from Newcastle Disease and Infectious Laryngotracheitis with a Recombinant Fowlpox Virus Co-Expressing the F, HN Genes of Newcastle Disease Virus and gB Gene of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Avian Dis*, 52(1), 111–117.

- Sun, Z., & Zhang, M. (2005). Effect of the infectious laryngotracheitis virus (ILTV) glycoprotein G on virus attachment, penetration, growth curve and direct cell-to-cell spread. *SCI CHINA SER C*, 48(5), 487–494. <http://doi.org/10.1360/062005-17>
- Sundick, R. S., & Gill-Dixon, C. (1997). A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *J Immunol*, 159, 720–725.
- Susta, L., Diel, D. G., Courtney, S., Cardenas-garcia, S., Sundick, R. S., Miller, P. J., Afonso, C. L. (2015). Expression of chicken interleukin-2 by a highly virulent strain of Newcastle disease virus leads to decreased systemic viral load but does not significantly affect mortality in chickens. *Virol J*, (2015), 1–17. <http://doi.org/10.1186/s12985-015-0353-x>
- Swayne, D. E., García, M., Spatz, S., & Guy, J. S. (2013). Infectious Laryngotracheitis. In *Diseases of Poultry* (13th ed., pp. 161–179).
- Taebipur, M. J., Dadras, H., Nazi, S., Afsar, M., & Ansari-Lari, M. (2017). Veterinary Immunology and Immunopathology Evaluation of blood monocyte and lymphocyte population in broiler chicken after vaccination and experimental challenge with Newcastle disease virus ☆. *Vet Immunol Immunopathol*, 190(71), 31–38. <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.07.002>
- Taghavian, O., Spiegel, H., Hauck, R., Hafez, H. M., Fischer, R., & Schillberg, S. (2013). Protective Oral Vaccination against Infectious bursal disease virus Using the Major Viral Antigenic Protein VP2 Produced in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, 8(12), 1–12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0083210>
- Tan, X., Brunovskis, P., & Velicer, L. F. (2001). Transcriptional Analysis of Marek's Disease Virus Glycoprotein D, I, and E Genes: gD Expression Is Undetectable in Cell Culture. *J Virol*, 75(5), 2067–2075. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.5.2067>
- Tang, M., Wang, H., Zhou, S., & Tian, G. (2008). Enhancement of the immunogenicity of an infectious bronchitis virus DNA vaccine by a bicistronic plasmid encoding nucleocapsid protein and interleukin-2. *J Virol Methods*, 149, 42–48. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.01.017>

- Tarpey, I., Davis, P. J., Sondermeijer, P., Geffen, C. Van, Versteegen, I., Kolodsick, J., Versteegen, I. (2007). Expression of chicken interleukin-2 by turkey herpesvirus increases the immune response against Marek ' s disease virus but fails to increase protection against virulent challenge Expression of chicken interleukin-2 by turkey herpesvirus increases the imm. *Avian Pathol*, 36(1), 69–74. <http://doi.org/10.1080/03079450601113159>
- Tarpey, I., van Loon, A. A., de Haas, N. De, Davis, P. J., Orbell, S., Cavanagh, D., Sundick, R. (2007). A recombinant turkey herpesvirus expressing chicken interleukin-2 increases the protection provided by in ovo vaccination with infectious bursal disease and infectious bronchitis virus. *Vaccine*, 25, 8529–8535. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.006>
- Telford, W. G., Hawley, T., Subach, F., Verkhusha, V., & Hawley, R. G. (2012). Flow cytometry of fluorescent proteins. *Methods*, 57(3), 318–330. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.003>
- Teng, Q., Zhou, J., Wu, J., Guo, J., & Shen, H. (2006). Characterization of chicken interleukin 2 receptor alpha chain , a homolog to mammalian CD25. *FEBS Letters*, 580(268), 4274–4281. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.044>
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., Borman, B. De, & Coumans, B. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75, 291–295.
- Thureen, D. R., & Keeler, C. L. (2006). Psittacid Herpesvirus 1 and Infectious Laryngotracheitis Virus: Comparative Genome Sequence Analysis of Two Avian Alphaherpesviruses. *J Virol*, 80(16), 7863–7872. <http://doi.org/10.1128/JVI.00134-06>
- Tong, G., Zhang, S., Meng, S., Wang, L., Qiu, H., Wang, Y., Wang, M. (2001). Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol*, 30, 143–148. <http://doi.org/10.1080/03079450120044542>
- Turner, A., Bruun, B., Minson, T., & Browne, H. (1998). Glycoproteins gB, gD, and gHgL of Herpes Simplex Virus Type 1 Are Necessary and Sufficient To Mediate Membrane Fusion in a Cos Cell Transfection System. *J Virol*, 72(1), 873–875.

- Uchida, H., Chan, J., Shrivastava, I., Reinhart, B., Grandi, P., Glorioso, J. C., & Cohen, J. B. (2013). Novel Mutations in gB and gH Circumvent the Requirement for Known gD Receptors in Herpes Simplex Virus 1 Entry and Cell-to-Cell Spread. *J Virol*, 87(3), 1430–1442. <http://doi.org/10.1128/JVI.02804-12>
- Vagnozzi, A., Zavala, G., Riblet, S. M., Mundt, A., Vagnozzi, A., Zavala, G., Mundt, A. (2012). Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens. *Avian Pathol*, 41(1), 20–31. <http://doi.org/10.1080/03079457.2011.631983>
- Vainio, O., & Inhof, B. A. (1995). The immunology and developmental biology of the chicken. *Immunol Today*, 16(8), 365–370.
- van Berkel, V., Barrett, J., Lee Tiffany, H., Fremont, D. H., Murphy, P. M., McFadden, G., Virgin IV, H. W. (2000). Identification of a Gammaherpesvirus Selective Chemokine Binding Protein That Inhibits Chemokine Action. *J Virol*, 74(15), 6741–6747.
- Vandaveer, S. S., Erf, G. F., & Durdik, J. M. (2001). Avian T Helper One/Two Immune Response Balance Can Be Shifted Toward Inflammation by Antigen Delivery to Scavenger Receptors. *Poult Sci*, 80, 172–181.
- Veits, J., Mettenleiter, T. C., & Fuchs, W. (2003). Five unique open reading frames of infectious laryngotracheitis virus are expressed during infection but are dispensable for virus replication in cell culture. *J Virol Methods*, 84, 1415–1425. <http://doi.org/10.1099/vir.0.18926-0>
- Wagner, R., Fliessbach, H., Wanner, G., Motz, M., Niedrig, M., Deby, G., Wolf, H. (1992). Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch Virol*, 127, 117–137.
- Wakenell, P. S., Bryan, T., Schaeffer, J., Avakian, A., Williams, C., Whitfill, C., Williams, B. C. (2002). Effect of In Ovo Vaccine Delivery Route on Herpesvirus of Turkeys/SB-1 Efficacy and Viremia. *Avian Dis*, 46(2), 274–280.
- Wang, C., Li, X., Zhang, C., Wu, T., Li, Y., & Cheng, X. (2015). A Eukaryotic Expression Plasmid

- Carrying Chicken Interleukin-18 Enhances the Response to Newcastle Disease Virus Vaccine. *Clin Vaccine Immunol*, 22(1), 56–64. <http://doi.org/10.1128/CVI.00636-14>
- Watrach, A. M., Hanson, L. E., & Watrach, M. A. (1963). The Structure of Infectious Laryngotracheitis Virus. *Virology*, 21(4), 601–608.
- Wigley, P., & Kaiser, P. (2003). Avian cytokines in health and disease. *BRAZ J POULTRY SCI*, 5(1), 1–14. <http://doi.org/10.1590/S1516-635X2003000100001>
- Williams, C. J., & Hopkins, B. A. (2010). Field evaluation of the accuracy of vaccine deposition by two different commercially available in ovo injection systems. *Poult Sci*, 90, 223–226. <http://doi.org/10.3382/ps.2010-00759>
- Williams, C. J., & Zedek, A. S. (2010). Comparative field evaluations of in ovo applied technology. *Poult Sci*, 89, 189–193. <http://doi.org/10.3382/ps.2009-00093>
- Winterfield, R. W., & So, I. G. (1968). Susceptibility of Turkeys to Infectious Laryngotracheitis. *Avian Dis*, 12(1), 191–202.
- Wu, C. C., Thiagarajan, D., & Lin, T. L. (1998). ELISPOT Assay for Detection of Antibody Secreting Cells to Infectious Bursal Disease Virus in Chickens. *Poult Sci*, 77, 662–665.
- Xu, J., Zhang, Y., & Tao, J. (2013). Efficacy of a DNA Vaccine Carrying Eimeria maxima Gam56 Antigen Gene against Coccidiosis in Chickens. *Korean J Parasitol*, 51(2), 147–154.
- Yin, R., Liu, X., Liu, C., Ding, Z., Zhang, X., Tian, F., Stoeger, T. (2011). Systematic selection of housekeeping genes for gene expression normalization in chicken embryo fibroblasts infected with Newcastle disease virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 413(4), 537–540. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.131>
- York, J. J., & Fahey, K. J. (1990). Humoral and cell-mediated immune responses to the glycoproteins of infectious laryngotracheitis herpesvirus. *Arch Virol*, 115, 289–297.
- York, J. J., & Fahey, K. J. (1991). Vaccination with affinity-purified glycoproteins protects chickens

- against infectious laryngotracheitis herpesvirus chickens against infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol*, 20, 693–704. <http://doi.org/10.1080/03079459108418808>
- York, J. J., Sonza, S., Brandon, M. R., & Fahey, K. J. (1990). Antigens of infectious laryngotracheitis herpesvirus defined by monoclonal antibodies. *Arch Virol*, 147–162.
- You, Z. Q., Yu, L., Zhang, C. Z., Li, L., Lu, M. J., Mao, Z. J., Chu, W. Y. (2007). Distribution and Expression of Recombinant Plasmid Encoding Chicken Interleukin-2. *Vet Res Commun*, 31, 273–285. <http://doi.org/10.1007/s11259-006-3441-y>
- Yu, Q., Spatz, S., Li, Y., Yang, J., Zhao, W., Zhang, Z., Zsak, L. (2017). Newcastle disease virus vectored infectious laryngotracheitis vaccines protect commercial broiler chickens in the presence of maternally derived antibodies. *Vaccine*, 35(5), 789–795. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.038>
- Zbinden, J. (2015). *Development of an ILTV vaccine - production and characterization of pseudotyped virus-like particles*. Doctoral Thesis, Vetsuisse, University of Zurich.
- Zhao, W., Spatz, S., Zhang, Z., Wen, G., Garcia, M., Zsak, L., & Yu, Q. (2014). Newcastle Disease Virus (NDV) Recombinants Expressing Infectious Laryngotracheitis Virus (ILTV) Glycoproteins gB and gD Protect Chickens against ILTV and NDV Challenges. *J Virol*, 88(15), 8397–8406. <http://doi.org/10.1128/JVI.01321-14>
- Zhuoran, L., Tang, X., Jingxia, S., Qin, M., Yin, G., Liu, X., & Suo, X. (2015). Transgenic Eimeria mitis expressing chicken interleukin 2 stimulated higher cellular immune response in chickens compared with the wild-type parasites. *Front Microbiol*, 6, 1–9. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00533>
- Ziemann, K., Mettenleiter, T. C., & Fuchs, W. (1998). Gene Arrangement within the Unique Long Genome Region of Infectious Laryngotracheitis Virus Is Distinct from That of Other Alphaherpesviruses, *J Virol*, 72(1), 847–852.

7 LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

| | |
|--------------|---------------------|
| Vorname Name | Julia Schädler |
| Geburtsdatum | 13.01.1988 |
| Geburtsort | Biberach an der Riß |
| Nationalität | deutsch |

Schul Ausbildung

| | |
|---------------------|---------------------------------------------------------------|
| Sept/94 – Sept/98 | Christoph-von-Schmid-Grundschule, Oberstadion, Deutschland |
| Sept/98 – Juni/2007 | Pestalozzi-Gymnasium, Biberach an der Riß, Deutschland |

Höchster Schulabschluss

| | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 22. Juni 2007 | Allgemeine Hochschulreife (Abitur) Pestalozzi-Gymnasium, Biberach an der Riß, Deutschland |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|

Studium

| | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Okt/07 – Sept/09 | Agrarbiologie, Universität Hohenheim, Stuttgart, Deutschland |
| Okt/09 – März/15 | Tiermedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland und Ecole nationale vétérinaire, Lyon, Frankreich |
| 24. März 2015 | Tierärztliche Prüfung Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland |
| Okt/15 – Jan/18 | Anfertigung der Dissertation |

Fachrelevante Anstellungen nach Abschluss des Studiums

| | |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| seit Okt/15 | Assistentin am Institut für Veterinärbakteriologie, Abteilung Geflügelkrankheiten der Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Dr. phil. nat. Nina Wolfrum für ihre ausdauernde, intensive, kompetente und freundliche Betreuung meiner Arbeit. Ihre Fachkenntnis, die stetige Beratung und ihre ständige Erreichbarkeit für Fragen aller Art waren für das Gelingen der Arbeit unverzichtbar.

Prof. Dr. Hoop möchte ich für die Vergabe des Dissertationsthemas und das Referat sehr herzlich danken. Bei Prof. Dr. Fraefel bedanke ich mich ebenfalls sehr herzlich für das Korreferat.

Bei allen Mitarbeiterinnen der Abteilung für Geflügel- und Kaninchenkrankheiten, möchte ich mich für die freundliche Aufnahme, Hilfsbereitschaft, Unterstützung und das gute Arbeitsklima bedanken. Ausdrücklich möchte ich Brigitte Sigrist für die Einarbeitung in molekularbiologische Arbeitsmethoden und die kompetente Unterstützung bei allen Fragen zur Laborarbeit danken.

Auch bei meinen Mitdoktoranden möchte ich mich für den felsenfesten Rückhalt in allen fachlichen, technischen und menschlichen Belangen ganz besonders bedanken. Sie sind mir neben wertvollen Kollegen auch gute Freunde geworden. Vielen Dank auch an alle Institutsmitglieder, die an dem freundlichen und kollegialen Arbeitsklima mitgewirkt haben und meine Doktorandenzeit zu einer sehr schönen Zeit für mich gemacht haben.

Der Dank schließlich, der meinen Eltern gebührt, ist mit Worten nicht auszudrücken. Sie haben mir alle Stufen gebaut, die ich erklimmen wollte und haben mich dabei in allen Lebenslagen motiviert und gefördert. Auf ihre Unterstützung kann und konnte ich immer bauen.